



Synthese, Metabolismus und Darreichungsformen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt

von

Sascha Illgner

aus Frankfurt am Main

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 06.10.2004 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Rudolf Matusch

Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Hanefeld

Tag der mündlichen Prüfung: 06.10.2004

Die vorliegende Arbeit entstand am
Fachbereich Pharmazie
im Institut für Pharmazeutische Chemie
der Philipps-Universität Marburg
auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. Rudolf Matusch

Für das interessante Themengebiet, seine stets großzügige fachliche, finanzielle und
persönliche Unterstützung sowie für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis
möchte ich ihm an dieser Stelle herzlich danken.

Danksagungen

Der Firma Lohmann Therapie-Systeme AG in Andernach danke ich für die finanzielle Unterstützung sowie die Möglichkeit zur Durchführung der Permeationsversuche. Für die Zusammenarbeit und die freundliche Aufnahme in ihre Teams möchte ich den Laborleitern Herrn Dr. Andreas Koch und Herrn Dr. Thomas Hille sehr herzlich danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Alfred Fahr und seinem Mitarbeiter Herrn Alexander Mohn von der Friedrich-Schiller-Universität in Jena möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bezüglich der Tablettierungsversuche bedanken.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Chemie in Marburg danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit, insbesondere gilt mein Dank der NMR-Abteilung sowie der massenspektroskopischen Abteilung.

Herrn Floris van Elsäcker danke ich herzlichst für seine Mithilfe im Labor, seine Diskussionsbereitschaft und seine stets fröhliche Art.

Meinen Kollegen Frau Konstanze An, Frau Tanja Buß, Frau Daniela Heller, Herrn Christian Licht, Herrn Christian Rack, Frau Sabine Schirra, Herrn Khaled Shannoon und Herrn Dr. Oliver Wachsmuth danke ich für die Zusammenarbeit und den Spaß innerhalb wie ausserhalb des Labors.

Bei meiner ehemaligen Kollegin Frau Dr. Susanne Hoßfeld möchte ich mich für ihre freundschaftliche private Hilfe besonders bedanken.

Meinen Freunden Frau Barbara Thum, Herrn Gerald Gräser, Herrn Alexander Kerr, Herrn Nic Bürgel sowie Herrn Martin Obst danke ich für die privaten guten Tage während der Promotionszeit.

Bei meiner Familie, die mich während meiner Zeit in Marburg intensiv unterstützt hat, möchte ich mich ganz besonders bedanken. Vor allem meinen zwei Patenkindern Nico und Pascal möchte ich für ihre ungezwungene liebe Art danken, die mich immer wieder zum Lachen bringt.

Mein besonderer Dank gilt schließlich Frau Sonja Schleich für das Korrekturlesen des Manuskriptes, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und Geduld in allen Phasen der Arbeit.

Für meine Eltern
in Liebe und Dankbarkeit

Denken und Tun, Tun und Denken - das ist die Summe aller Weisheit. Beides muß wie Aus- und Einatmen sich im Leben hin und wider bewegen; wie Frage und Antwort sollte eines ohne das andere nicht stattfinden.

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis**Theoretischer Teil****Seite**

1.	Einleitung	1
2.	Aufgabenstellung und Zielsetzung	5
3.	Peganum harmala L./ Zygophyllaceae	6
3.1.	Beschreibung der Pflanze	6
3.2.	Hauptinhaltsstoffe	7
3.3.	Wirkung der Chinazolin-Alkaloide	7
4.	Enzyme/ Rezeptor	8
4.1.	Acetylcholinesterase	8
4.2.	Monoaminoxidase (MAO)	9
4.3.	nikotinischer Acetylcholinrezeptor	10
5.	Therapieansätze	11
5.1.	Alzheimer-Krankheit	12
5.1.1.	Pathogenese des Morbus Alzheimer	12
5.1.2.	Medikation	15
5.2.	Alkoholismus	17

5.3.	Nikotinabusus	18
5.3.1.	Wirkung von Nikotin	19
5.4.	Zusammenhang Nikotin/ Alkohol/ psychische Erkrankungen	20
6.	Synthese von Desoxypeganin	21
6.1.	Biosynthese von Chinazolin Alkaloiden in Peganum harmala	22
6.2.	Synthese der Zwischenstufe Pegenon	22
6.3.	Clemmensen-Reduktion von Pegenon zum Desoxypeganinkomplexsalz	25
6.4.	Aufrahmen der Base Desoxypeganin	27
6.5.	Alternative Syntheseveruche	27
6.5.1.	Verwendung von anorganischen Salzen	27
6.5.2.	Verringern des Lösungsmittels 2-Pyrrolidinon	28
6.5.3.	Clemmensen-Reduktion mit Schwefelsäure	28
6.6.	Zusammenfassung der Synthese	29
7.	Verhalten von Desoxypeganin gegenüber Oxidantien	30
7.1.	Herstellung und Charakterisierung von Oxidationsprodukten	31
7.2.	Analytik des Oxidationsansatzes	32
7.3.	Strukturaufklärung der Oxidationsprodukte	33
7.4.	Oxidationsversuche mit Mikrowellen als Energiequelle	40
7.4.1.	N-Oxidation im Sauren	41
7.4.2.	N-Oxidation im Basischen	43
7.5.	Desoxypeganin-N-Oxid und Pegenon-N-Oxid	45

8.	Biotransformation von Desoxypeganin	45
8.1.	Die Leber als Enzymquelle	46
8.1.1.	Aufarbeitung der Kaninchenleber (9000 g Überstand)	47
8.2.	Cytochrom P450	49
8.2.1.	Isoenzyme des Cytochrom P450-Systems	50
8.3.	Inkubation mit dem 9000 g Überstand	51
8.4.	Identifizierung der Hauptmetaboliten	53
8.5.	Quantifizierung der Hauptmetaboliten	56
8.6.	Enzymkinetische Betrachtung	58
8.6.1.	Proteinbestimmung nach Biuret	58
8.6.2.	Gehaltsbestimmung von Cytochrom P450	59
8.6.3.	Michaelis-Menten Kinetik und Lineweaver-Burk Linearisierung	60
8.7.	Inkubationsversuche mit menschlicher Leber (S9 Mix)	63
9.	Pharmazeutische Salze von Desoxypeganin	65
9.1.	Herstellung von Desoxypeganin-Salzen	66
9.2.	Direktablettierung von Desoxypeganin-Salzen	69
9.3.	Optimierung der Herstellung von Desoxypeganinhydrochlorid und Desoxypeganinhydrobromid	71
9.4.	„Direktablettierungsversuche“ mit den optimierten Desoxypeganin- Salzen	71
9.5.	Schlussfolgerung aus der Direktablettierung und der Salzherstellung	73

10.	Transdermale Therapeutische Systeme (TTS) mit Desoxypeganin als Wirkstoff	74
10.1.	Hautaufbau und transdermalen Transport	75
10.2.	Membran- und Matrixpflaster	78
10.3.	TTS-Formulierungen von Desoxypeganin	79
10.3.1.	Selbstklebende Matrices	79
10.3.2.	Penetrationsförderung durch „Enhancer“	80
10.3.3.	Herstellung der TTS-Formulierungen von Desoxypeganin	81
10.4.	Experimenteller Aufbau des Permeationstests	81
10.5.	Permeationsergebnisse der TTS-Formulierungen	83
10.6.	Permeationsversuche mit Desoxypeganin-Salzen	84
10.7.	Permeationsversuche Desoxypeganin gegen Pegenon	87
10.8.	Permeationsversuche weiterer Dihydrochinazoline und Chinazolinone	88
11.	Zusammenfassung und Ausblick	90

<u>Experimenteller Teil</u>	<u>Seite</u>
1. Allgemeine Methoden und Materialien	93
1.1. Chromatographie	93
1.1.1. HPLC-Geräte	93
1.1.2. Übersicht über die verwendeten HPLC-Systeme	94
1.2. Eingesetzte Materialien	97
1.2.1. Lösungsmittel	97
1.2.2. Chemikalien	97
1.2.3. Haftkleber und sonstige Matrix-Bestandteile	97
1.2.4. Folienmaterial	98
1.3. Schmelztemperaturen	98
1.4. Spektroskopie	99
1.4.1. NMR-Spektren	99
1.4.2. Massenspektrometrische Bestimmungen	100
1.4.3. Infrarotspektren	100
1.4.4. Elektronenspektren	101
1.5. Geräte für die präparative Synthese von Pegenon und Desoxypeganin	101
1.6. Gerät für Mikrowellenversuche	102
1.7. Geräte für Biotransformationsversuche	102
1.8. Mikroskopische Untersuchung der Desoxypeganin-Salze	102
1.9. Tablettenherstellung und Charakterisierung	103

2.	Arbeitsvorschriften zur Herstellung von Desoxypeganin	104
2.1.	Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Zwischenstufe Pegenon	104
2.2.	Arbeitsvorschrift zur Herstellung von Desoxypeganin	106
2.3.	Alternative Synthesevorschriften für die Herstellung von Pegenon	108
2.3.1.	Allgemeine Vorschrift bei Verwendung von anorganischen Salzen	108
2.3.2.	Allgemeine Vorschrift mit reduzierter Menge an 2-Pyrrolidinon	110
2.4.	Alternative Synthesevorschriften für die Herstellung von Desoxypeganin	111
2.4.1.	Allgemeine Vorschrift bei Verwendung von Schwefelsäure	111
3.	Bearbeitung des Desoxypeganin-Wasserstoffperoxid-Ansatzes	112
3.1.	Arbeitsvorschrift zur Herstellung des Oxidationsansatzes	112
3.2.	Präparative Trennung der Hauptsubstanzen	112
3.3.	Präparativ getrennte Substanzen	113
4.	Oxidationsversuche mit Mikrowellen als Wärmequelle	117
4.1.	Oxidation im sauren Milieu	117
4.2.	Oxidation im basischen Milieu	117
5.	Biotransformationsversuche mit 9000 g Überstand	119
5.1.	Allgemeine Vorschrift zur Herstellung des 9000 g Überstandes	119
5.2.	In-vitro Inkubationsansätze	119
5.3.	Erstellung einer Eichgeraden und Bestimmung der Wiederfindungsrate	120
5.4.	Hauptmetabolite	121

5.5.	Enzymkinetische Betrachtungen	123
5.5.1.	Proteinbestimmung nach Biuret	123
5.5.2.	Gehaltsbestimmung von Cytochrom P450	125
5.5.3.	Michaelis-Menten Kinetik und Lineweaver-Burk Linearisierung	125
5.6.	Inkubationsversuche mit S9 Mix (menschliche Leber)	127
6.	Desoxypeganin- Salze	129
6.1.	Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von Desoxypeganin-Salzen mit Ethanol	129
6.2.	Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von Desoxypeganin-Salzen mit Aceton	130
6.3.	Kernresonanzmessung der protonierten Desoxypeganin-Base	131
7.	Desoxypeganin-Tabletten	132
7.1.	Allgemeine Vorschrift zur Direkttablettierung von Desoxypeganin-Salzen	132
8.	Transdermale Therapeutische Systeme	133
8.1.	Herkunft und Präparation des eingesetzten Hautmaterials	133
8.2.	Allgemeine Vorschrift zur Herstellung eines TTS mit Polyacrylaten	133
8.3.	Allgemeine Vorschrift zur Herstellung eines TTS mit Abitol/Hercures®	134
8.4.	Allgemeine Vorschrift für die Olivenöl-Formulierungen	134
8.5.	Durchführung der Permeationsmessung	135
8.6.	Permeationsergebnisse der Dihydrochinazoline und Chinazolinone	136

9.	Synthese der Dihydrochinazoline und Chinazolinone	137
9.1.	N-Acetylanthranilsäure, Methaqualon und Huminal	137
9.2.	2-Methyl-3-phenylchinazolin-4-on und 2-Methyl-3-phenyl-3,4-dihydrochinazolin	143
	Literatur- und Quellenverzeichnis	147

Abkürzungen und Akronyme

Abb.	Abbildung
^{13}C -NMR	breitbandentkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum
CI	chemische Ionisation
COSY	Correlated Spectroscopy
CYP 450	Cytochrom P 450
DMSO	Dimethylsulfoxid
EI	Elektronenstossionisation
ESI	Elektrosprayionisation
^1H -NMR	vollständig gekoppeltes ^1H -NMR-Spektrum
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR	High Resolution
http	Hyper Text Transfer Protocol
LC	Liquid Chromatography
MG	Molekulargewicht
MS	Mass Spectroscopy
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PDA	Photodiode-Array-Detector
ppm	parts per million
RP	Reversed Phase
UV	ultraviolett, Ultraviolettspektroskopie
Vis	visible, sichtbarer Bereich
www	world wide web

THEORETISCHER TEIL

1. Einleitung

Suchterkrankungen verursachen weltweit sehr grosse gesellschaftliche und wirtschaftliche Probleme. Die sogenannten stoffgebundenen Süchte (z.B. Alkohol-, Nikotin-, Heroinsucht) haben zusätzlich zur Suchterkrankung an sich eine Reihe von körperlichen und psychischen Begleiterkrankungen zur Folge. Ein einfacher Verzicht auf Drogen ist durch den alleinigen Willen des Abhängigen im Normalfall nicht möglich. Ziele der Forschung sind deshalb neue Substanzen und Ansätze, die den Teufelskreis der Sucht unterbinden.

Sucht kann definiert werden als unabweisbares Verlangen nach einem bestimmten Gefühls-, Erlebnis- oder Bewusstseinszustand. Das Ziel von süchtigem Verhalten ist entweder Lustgefühle herbeizuführen und/oder Unlustgefühle (Unruhe, Trauer, Wut etc.) zu vermeiden. Süchtiges Verhalten zielt also auf die qualitative Veränderung des momentanen Erlebniszustandes und beinhaltet stets die Manipulation der eigenen Befindlichkeit. Suchtursachen sind im Zusammenwirken der Faktoren Mensch, Gesellschaft und Suchtmittel zu beschreiben. Individueller Grund ist eine Autonomiestörung, die als Selbstwertschwäche deutlich wird. Um von Suchtverhalten zu sprechen, müssen die vier Merkmale Wiederholungszwang, Dosissteigerung, physische oder psychische Abhängigkeit und Entzugerscheinungen klar ausgeprägt sein [1].

Im offiziellen Sprachgebrauch der Weltgesundheitsorganisation (WHO) existierte der Begriff „Sucht“ von 1957 – 1964. Danach wurde er durch „Missbrauch“ und „Abhängigkeit“ ersetzt. Die medizinische Definition nach ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Disorders, 10th Revision) der WHO von 1992 unterscheidet:

Drogenmissbrauch

- Gelegentlicher Konsum
- Gesundheitsschädigung durch Konsum

Drogenabhängigkeit

- Starkes Bedürfnis nach Konsum
- Anhaltender Konsum trotz Gesundheitsschädigung
- Vorrang des Konsums vor anderen Aktivitäten und Verpflichtungen
- Toleranzentwicklung
- Manchmal körperliches Entzugssyndrom

Das letzte Jahrzehnt erbrachte grosse Fortschritte in der Behandlung der Abhängigkeit. Auf neuen Erkenntnissen über die Physiologie des Gehirns basierend, werden immer neue Therapiestrategien ausgearbeitet. Die Abhängigkeit wird verursacht durch adaptive Veränderungen im zentralen Nervensystem und das sogenannte Craving wird für den Rückfall verantwortlich gemacht. Dabei spielt der dopaminerge Haushalt und die allgemein erhöhte Reizbarkeit der Neuronen eine wichtige Rolle.

Beim Konsum einer psychoaktiven Substanz bekommen vorhandene Umfeldreize durch klassisches Konditionieren einen positiven Anreizwert für die positiven Wirkungen der Droge. Die Umfeldreize sorgen bei wiederholtem Drogenkonsum dafür, dass der Körper die Wirkung der Droge kompensieren kann. Die Umfeldreize können dann zu Auslösereizen für den Drogenkonsum werden, indem sie auch bei Ausbleiben der Droge die Kompensation hervorrufen. Damit wird ein starkes Verlangen (Craving) nach der Droge ausgelöst, um ein Wohlbefinden zu erreichen [1,2]. Die Behandlung mit

sogenannten Anti-Craving Substanzen wie Acamprosat sind nur bei glaubhaft zur Abstinenz bereiten Patienten zu erwägen [3,4].

Weitere pharmakologische Ansätze zielen auf die Inhibierung des Calciumkanals oder NMDA-Rezeptors, die Stimulierung des inhibitorischen GABAergen Systems oder auf ein Abschwächen der hyperaktiven dopaminergen Neurone [5,6]. Eine wichtige Gruppe von Wirkstoffen beinhaltet die agonistische Therapie, auch Substitutionstherapie genannt. Bei der Heroin- bzw. Opiatsubstitutionstherapie werden Agonisten wie Buprenorphin oder Methadon schon seit Jahrzehnten eingesetzt [7]. Diese besitzen eine geringere intrinsische Aktivität an Opioid-Rezeptoren mit einer verlängerten Halbwertszeit. Ein weiteres Beispiel der Substitution ist der Einsatz von z. B. Nikotinplastern zur Raucherentwöhnung. Die kontinuierliche Zufuhr geringer Mengen an Nikotin verringert das Craving und kann der Einzelperson helfen mit dem Rauchen aufzuhören [6]. Das Nikotinplaster hat grosse Erfolge in der Suchttherapie aufzuweisen und ist eines der umsatzstärksten Arzneimittel aller Zeiten.

Die Entwicklung eines Antagonisten am Cholecystokinin-Rezeptor (CCK₂ bzw. CCK-B), u.a. zur Behandlung der Drogenabhängigkeit, wird seit vielen Jahren von Pharmazeutischen Firmen wie Lilly, Merck oder Parke-Davis verfolgt. Dabei gehen sie von einer nicht-peptidischen Chinazolinon-Leitstruktur, dem Asperlicin aus [7,8]. Das Cholecystokinin interagiert mit anderen Neurotransmittern in einigen Hirnregionen, v. a. mit Dopamin. Der Einsatz eines CCK-B Antagonisten zur Behandlung von neuropsychiatrischen Erkrankungen und der Drogenabhängigkeit liegt nahe. Bis jetzt ist noch kein Arzneistoff gegen die Indikation Drogenabhängigkeit auf dem Markt.

Die Firma Pfizer wählt für die Raucherentwöhnung einen anderen Angriffspunkt ihres neuen Wirkstoffes Varenicline. Varenicline ist ein partieller Agonist am $\alpha_4\beta_2$ -

nikotinischen Acetylcholinrezeptor und basiert auf Forschungen der damaligen UdSSR aus den 60-er Jahren an dem Naturstoff Cytisin. Dieser Wirkstoff befindet sich momentan (Sommer 2004) in der Endphase der klinischen Phase III mit sehr guten Erfolgen. Die Entwicklungskosten betragen bis dato geschätzte 900 Millionen Dollar.

Ein weiterer sehr hoffnungsvoller Wirkstoff wird von der Firma Sanofi-Synthelabo entwickelt. Rimonabant (AcompliaTM) greift in das überaktive Endocannabinoid-System ein und wird als selektiver CB₁-Antagonist bezeichnet. Dieser wirkt dabei als Craving-Inhibitor und Appetitzügler zugleich. Für den übergewichtigen Raucher wäre Rimonabant als Doppeltherapie gedacht und würde die Gewichtszunahme nach der Raucherentwöhnung bremsen. Exzessives Essen, Anhäufung von Fett und chronischer Tabakgebrauch „überstimulierten“ das Endocannabinoid-System, vor allem die CB₁-Rezeptoren, welche im zentralen Nervensystem und an Fettzellen lokalisiert und damit an der Nahrungsmittelaufnahme sowie der Nikotinabhängigkeit beteiligt sind [10,11]. Die klinische Phase III soll Ende 2004 fertiggestellt sein. Bei einer Milliarde übergewichtigen Menschen auf der Welt und bei jedem zweiten Todesfall von Langzeit-Rauchern durch eine Nikotin-verursachte Erkrankung kann man das Rimonabant als eines der zukunftssträchtesten Produkte überhaupt bezeichnen. Die Entwicklungen im Frühjahr 2004 mit der Übernahme von Aventis durch Sanofi-Synthelabo haben gezeigt, wieviel Umsatz und Gewinn sich u. a. durch diesen Wirkstoff erhofft wird. Diese zwei neuen Wirkstoffe zeigen das grosse Bestreben der Firmen in dieses Indikationsgebiet und auf diesen sehr grossen Markt einzudringen.

Desoxypeganin, das hier in dieser Arbeit untersuchte Alkaloid, könnte als „dritter Weg“ mit einem kombinierten cholinergen und dopaminergen Mechanismus gut in der

Alkohol- und Rauchertherapie positioniert werden. Andere Indikationsgebiete wie die Alzheimer-Krankheit sind ebenso denkbar.

2. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Auf das Alkaloid Desoxypeganin wurden wir durch eine industrielle Kooperation aufmerksam. Dieses Alkaloid mit einer Dihydrochinazolin-Grundstruktur wird von einem Institut in Taschkent/ Uzbekistan („Institute of the Chemistry of Plant Substances“) seit Jahrzehnten untersucht und es wurde in den Zeiten der UdSSR an Alkoholabhängigen getestet. Die Isolierung aus der natürlichen Quelle der Steppenraute ist sehr zeitaufwändig und man kann nur geringe Mengen an Alkaloid gewinnen. Problematisch ist also die Bereitstellung einer für weitergehende Untersuchungen ausreichende Menge. Deshalb musste eine Synthese ausgearbeitet werden, die sich bis in den industriellen Maßstab erweitern lässt. Die Synthese grösserer Mengen war auch notwendig, um diesen neuen Wirkstoff mit seinen chemischen und physikalischen Eigenschaften weiter charakterisieren zu können. Auch ist die frühzeitige Erforschung des Metabolismus wichtig, da dieser über die weitere Entwicklung einer Substanz zum Arzneistoff entscheidet. Für die spätere Anwendung eines Wirkstoffes am Patienten ist eine pharmazeutische Darreichungsform notwendig. Die Entscheidung fiel auf die Herstellung der meistverbreitesten Darreichungsform Tablette sowie die Entwicklung eines Transdermalen Therapeutischen Systems (TTS). Neben der Verpressbarkeit unterschiedlicher Desoxypeganin-Salze sowie deren Charakterisierung sollten auch verschiedene TTS-Formulierungen mit unterschiedlichen Klebern und Enhancern hergestellt und das Permeationsverhalten des Wirkstoffes durch humane Vollhaut untersucht werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist also die umfassende Bearbeitung und Charakterisierung eines neuen Arzneistoffkandidaten von der Synthese über den Metabolismus bis zur Entwicklung von verschiedenen Darreichungsformen.

3. Peganum harmala L./ Zygophyllaceae

Die Steppenraute, *Peganum harmala* L./ Zygophyllaceae, ist eine heilige Pflanze des alten Orients. Heutzutage ist der Gebrauch von Steppenraute in Marokko noch üblich. Der Rauch soll vor dem bösen Blick schützen, Teufel und Dämonen vertreiben, hellsehtig machen und berauschen. Schamanen verbrennen die Samen rituell unter Rauchentwicklung, um sich in Ekstase zu versetzen. In Indien werden die Samen als Weihrauch gehandelt, um die Geburt zu erleichtern. Den Schamanen Nepals dienen die Samen als magisches Räuchermittel.

3.1. Beschreibung der Pflanze

Peganum harmala L. ist ein ganzjähriges unbehaartes Kraut mit einer Grösse von dreissig bis einhundert Zentimeter, das in trockenen Gebieten von Spanien, Nordafrika, Südosteuropa und im indischen Raum beheimatet ist. Im Iran ist diese Pflanze unter dem Namen „Espand“ bekannt und wird als „Harmel“ in Nordafrika und „African Rue“, „Mexican Rue“ oder „Turkish Rue“ in den USA bezeichnet. Sie hat einzelne weisse Blüten und schmale Blätter, die nach Zerknicken sehr intensiv riechen. Die Früchte sind runde Kapseln, die in ihren drei Kammern eckige schwarze Samen enthalten [12]. Der bittere Geschmack der Pflanze stösst im Normalfall Tiere ab, die nur bei

Futterknappheit dieses Kraut zu sich nehmen. Dabei kommt es vor allem bei Kamelen immer wieder zu Vergiftungen [13].

3.2. Hauptinhaltsstoffe

Die Familie der Zygophyllaceae besteht aus 30 Gattungen und 235 Arten, wobei nur aus sechs Gattungen und 19 Arten insgesamt 117 verschiedene Alkaloide isoliert werden konnten. Die pharmakologisch aktiven Substanzen von *Peganum harmala* sind verschiedene Alkaloide, die man vorwiegend in den Samen und Wurzeln findet. Dabei stellen die β -Carboline mit Harmin, Harmalin, Harmalol und Harman die Hauptalkaloide dieser Pflanze dar. Zusätzlich enthalten vor allem die Samen Chinazolin-Alkaloide (Abb. 1) wie Vasicin (=Peganin) (1), Vasicinon (2) und Desoxypeganin (3) [14]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Samen von *Peganum harmala* eine antibakterielle, fungizide und antivirale Aktivität [15,16] sowie einen antineoplastischen Effekt in-vitro und in-vivo aufweisen [17,18]. Diese Effekte sind vorwiegend auf die β -Carboline zurückzuführen. Bei der weiteren Betrachtung wird sich auf die Chinazolin-Alkaloide, auch Alkaloide vom Peganin-Vasicinon-Typ, konzentriert.

3.3. Wirkung der Chinazolin-Alkaloide

Bisher wurden ungefähr 50-60 Alkaloide mit Chinazolin-Grundkörper aus den verschiedensten Familien wie z.B. Rutaceae, Acanthaceae, Scrophulariaceae und Zygophyllaceae isoliert [19,20]. Die Chinazolin-Alkaloide von *Peganum harmala*, Vasicin (1) und Vasicinon (2), besitzen eine bronchodilatorische Aktivität [12,21] und

zeigen im Tierversuch abortive Effekte [22,23]. Desoxypeganin (3) weist eine Monoaminoxidase-Hemmung auf und die synaptische Konzentration der Monoamine wie Noradrenalin, Adrenalin, Serotonin und Dopamin nimmt im Gehirn zu. Weiterhin kommt es zu einer Modulation des cholinergen Systems und zu einer reversiblen Inhibition der Acetylcholinesterase. Dieser anticholinerge Effekt ist dabei im Tierversuch doppelt so stark ausgeprägt wie bei dem Wirkstoff Galanthamin (Reminyl®) bei einer geringeren Toxizität [24].

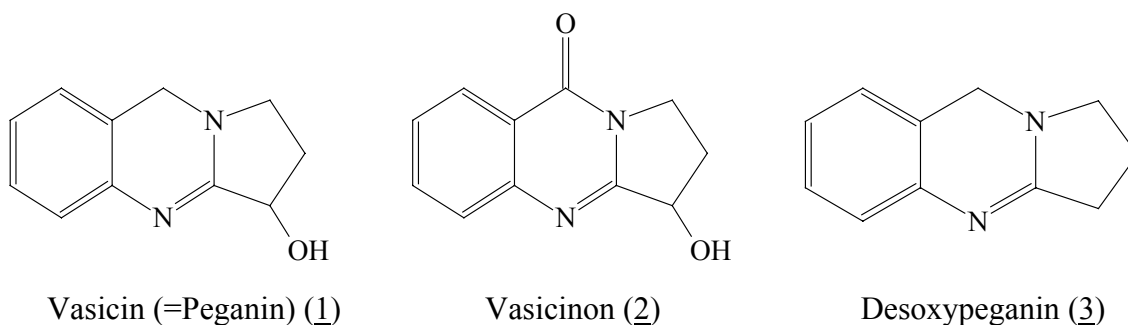


Abb. 1: Chinazolin-Alkaloide, auch Alkaloide vom Peganin-Vasicinon-Typ genannt.

4. Enzyme/ Rezeptor

4.1. Acetylcholinesterase

Das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) spielt eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung durch Nervenzellen. Es ist an membranäre Glykolipide gebunden und wird in den synaptischen Spalt hinein ausgeschüttet. Dort ist es für den Abbau des cholinergen Transmitters Acetylcholin in Cholin und Essigsäure zuständig. Das unwirksame Cholin wird aktiv in das Axon wieder aufgenommen und die Essigsäure mit dem Blut abtransportiert (Abb. 2).

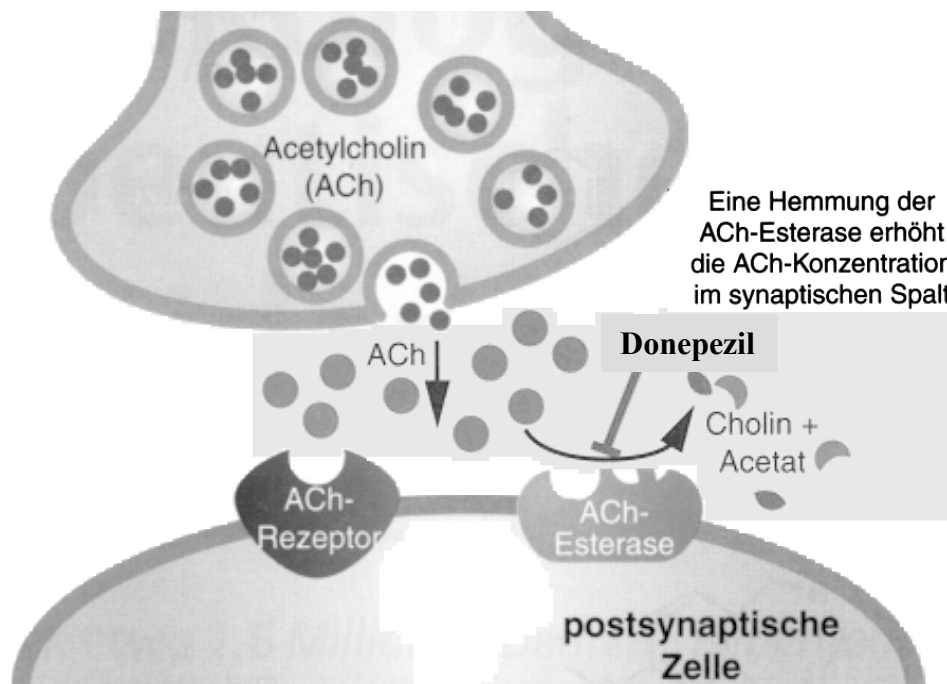


Abb. 2: Schematische Darstellung der cholinergen Übertragung nach [25].

Die Acetylcholinesterase kann z. B. durch Alkylphosphate wie E 605 gehemmt werden, die sehr stabile kovalente Phosphoryl-Enzym-Komplexe bilden. Es kommt dann zu einer ständigen Reizweiterleitung, da das Acetylcholin nicht mehr abgebaut wird. Inhibitoren der AChE wie z.B. Donepezil werden als Medikamente gegen neurologische Störungen wie Myasthenia Gravis oder der Alzheimer-Krankheit eingesetzt [26,27].

4.2. Monoaminoxidase (MAO)

Die Monoaminoxidase katalysiert die oxidative Desaminierung von biogenen Aminen inklusive der Neurotransmitter Dopamin, Noradrenalin, Tyramin und Serotonin (5-HT). Man unterscheidet zwischen MAO-A und MAO-B, die sich in ihrer Substratspezifität, Inhibitorsensitivität und ihrer zellulären Lokalisation unterscheiden [28,29]. Dabei bevorzugt MAO-A Serotonin und Noradrenalin als Substrate und MAO-B Dopamin

und weitere exogene Monoamine. Die Fähigkeit der Monoaminoxidase zur Metabolisierung der Neurotransmitter zeigt, dass diese Enzyme eine grosse Rolle im menschlichen Verhalten und bei neuronalen Funktionsstörungen spielen. So kann man MAO-A Inhibitoren effektiv bei der Behandlung von Depressionen [30] und Angstzuständen [31] einsetzen. Die Behandlung der Erkrankungen Parkinson [32] und Alzheimer [33] sind durch den Einsatz von MAO-B Inhibitoren möglich. Durch die Hemmung der MAO nimmt die synaptische Konzentration der Neurotransmitter im Gehirn zu und diese Anreicherung kann sich dann günstig auf den Krankheitsverlauf auswirken.

4.3. Nikotinischer Acetylcholinrezeptor

Der nikotinische Acetylcholinrezeptor (n-Cholinozeptor) gehört zu der Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle. Diese Rezeptoren haben eine pentamere Struktur und bilden eine zentrale membranäre Pore. Man kann diese in drei Unterfamilien einordnen. Die erste Unterfamilie besteht aus α_1 , β_1 , γ , ϵ und δ -Untereinheiten und ist vorwiegend in der Skelettmuskulatur lokalisiert. Die beiden anderen Unterfamilien sind hauptsächlich neuronale Rezeptoren, die heteromer aus den Untereinheiten α_3 , α_4 , α_6 und β_2 oder β_4 oder homomer aus den Untereinheiten α_7 , α_8 , α_9 aufgebaut sind. Es gibt verschiedene nikotinische Rezeptoren, die im menschlichen Gehirn exprimiert werden (Abb. 3). Dabei zählen die Subtypen $\alpha_4\beta_2$ und α_7 zu den wichtigsten. Sie sind gekennzeichnet durch eine verstärkte Sensivität und Permeabilität gegenüber Calciumionen und spielen eine grosse Rolle in der neuronalen Erregbarkeit und im cholinergen System [34]. Der nikotinische Acetylcholinrezeptor selbst ist ein Natriumkanal.

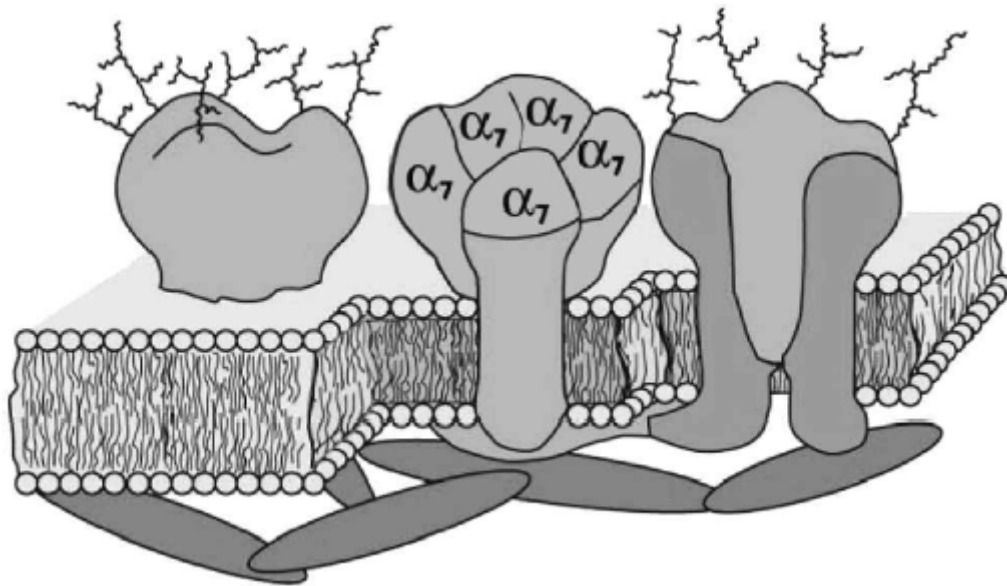


Abb.3: α_7 Subtyp des nikotinischen Acetylcholinrezeptor [34].

Die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren sind involviert in komplexe kognitive Funktionen wie Aufmerksamkeit, Lernen, Gedächtnisleistung und Empfindungsvermögen.

5. Therapieansätze

Auf das Anwendungsgebiet Alzheimer-Krankheit soll im folgenden genauer eingegangen werden. Nikotinsucht, Alkoholismus und psychische Erkrankungen werden thematisch nur sekundär behandelt. Dabei sollen neben den wissenschaftlichen Aspekten auch die sozialen und wirtschaftlichen Probleme kurz beleuchtet werden.

5.1. Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Krankheit ist eine hirnorganische Erkrankung, die sich im fortschreitenden Untergang von Neuronen äussert. Das Krankheitsbild umfasst Gedächtnis- und Orientierungsstörungen sowie Beeinträchtigungen des Denk- und Urteilsvermögens, was die Bewältigung eines normalen Alltagslebens immer schwieriger macht. Die Patienten sind auf zunehmende Hilfe und Unterstützung angewiesen. Morbus Alzheimer wird zu den primär zerebral bedingten Demenzen gezählt wie auch Morbus Parkinson. Die Häufigkeit nimmt im Lebensalter von 50 bis 90 Jahren exponentiell zu und statistisch leidet jede zweite Person mit 85 Jahren an dieser Erkrankung [25]. In Deutschland gibt es rund 1,6 Millionen Demenzpatienten, die jährlich für ihre Betreuung Kosten von 40 Milliarden Euro verursachen. Weltweit geht man von 17 – 25 Millionen Patienten aus. Morbus Alzheimer gilt in den westlichen Ländern als vierthäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs und Apoplexie [35,36]. Die Kombination aus steigender Prävalenz und einer langjährigen intensiven Betreuung, die Patienten leben nach der Diagnose Alzheimer im Durchschnitt noch sieben Jahre, stellt eine grosse soziale und ökonomische Belastung für die betroffenen Familien und die Gesellschaft dar.

5.1.1. Pathogenese des Morbus Alzheimer

Die Ursachen für die Demenz sind äusserst vielschichtig und beinhalten die Schädigung und die Degeneration von Neuronen, die Bildung von neuronalen Plaques und neurofibrillären Bündeln im Gehirn. Bei der Schädigung der Neurone sind mehrere pathologische Prozesse beteiligt wie die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen, ein

Mangel an Wachstumsfaktoren, Apoptosevorgänge, Plaquebildung, Störungen der cholinergen, dopaminergen und glutamatergen Transmittersysteme und/oder eine gestörte zelluläre Calciumhomöostase (Abb. 4).

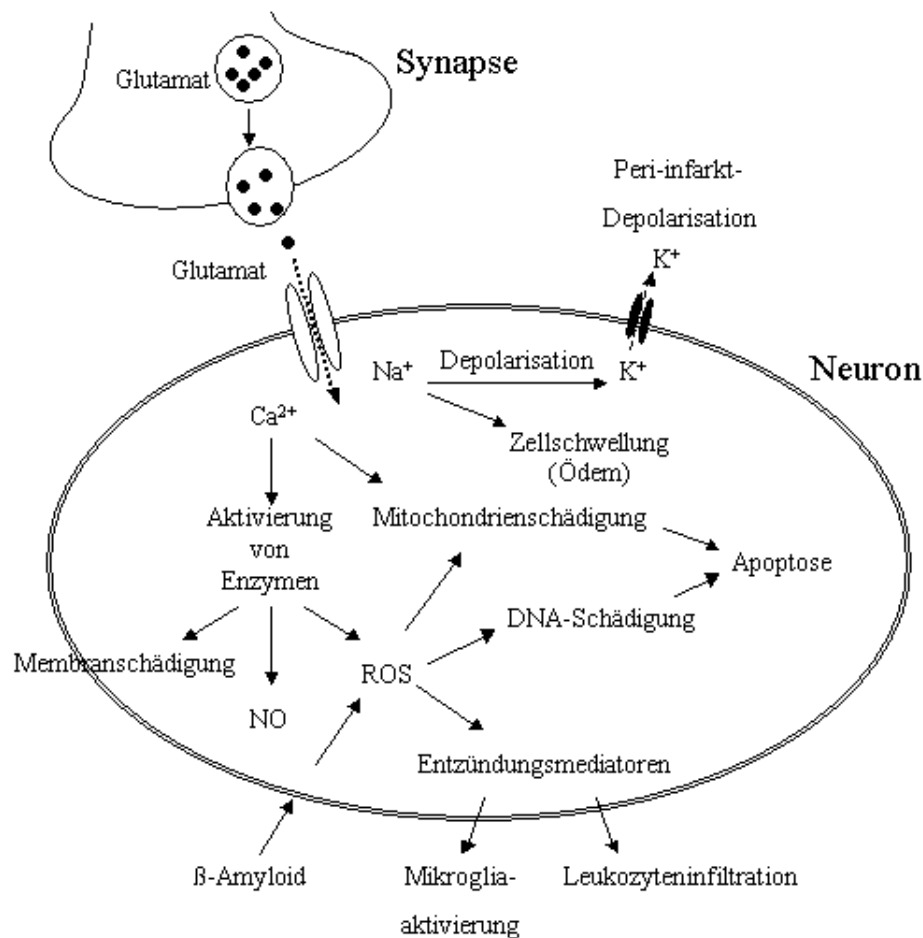


Abb. 4: Mögliche Ursachen, die zu einer Schädigung eines Neurons führen können, nach Literaturquelle [25] verändert.

Eine effektive Behandlung mit Pharmaka ist aufgrund der Vielzahl der betroffenen neuronalen Systeme schwierig. Hinzu kommt, dass Symptome einer Demenz erst auftreten, wenn schon eine grössere Anzahl der Neuronen irreversibel geschädigt sind

und man dann mit beeinflussenden Pharmaka das entstandene Ungleichgewicht im Neurotransmitterhaushalt nicht mehr ausgleichen kann.

Die neuronalen Plaques bestehen vorwiegend aus dem sogenannten β -Amyloid [37]. Dieses β -Amyloid entsteht durch Endoproteolyse mit β - und γ -Sekretasen aus einem Vorläuferprotein, dem Amyloid-Prekursor-Protein (APP). Es wird durch ein Gen codiert, welches auf dem Chromosom 21 lokalisiert ist. Dies erklärt auch das frühe Auftreten der klassischen Alzheimer-Symptome bei Patienten mit Trisomie 21, Down Syndrom, beginnend ab einem Lebensalter von 40 Jahren [38]. Das β -Amyloid-Protein existiert in vier unterschiedlichen Formen, die sich in ihrer Kettenlänge von 39 – 43 Aminosäuren unterscheiden. $A\beta_{1-42}$ und $A\beta_{1-43}$ sind dabei diejenigen Formen, die vorwiegend in den neuronalen Plaques gefunden werden [36,39]. Ein spezieller Nikotinrezeptor (Subtyp α_7), der in verschiedenen kortikalen Gebieten des Gehirns wie den Basalganglien, dem Thalamus oder dem Hippocampus lokalisiert ist, wird durch die Anhäufung des β -Amyloid-Proteins chronisch stimuliert [40]. Dies löst eine Signalkaskade aus und hat ein Ungleichgewicht der beiden Kinasen ERK2 („extracellular signal-regulated kinase“) und MAPK („mitogen-activated protein kinase“) zur Folge. Dieses Ungleichgewicht spielt eine entscheidende Rolle beim Gedächtnisverlust und Störungen des Denkvermögens bei der Alzheimer-Krankheit [41]. Die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren sind damit involviert in komplexe kognitive Fähigkeiten wie Aufmerksamkeit, Lernen, Wahrnehmung und Erinnerungsvermögen [42].

5.1.2. Medikation

Trotz intensiver Bemühungen der Wissenschaft auf molekularer und zellulärer Basis sind bis jetzt noch keine heilenden oder kausalen Behandlungen möglich. Die heute üblichen Therapieansätze behandeln ausschliesslich die Symptome der Alzheimer-Krankheit. Die Wirkstoffe greifen vorwiegend in den cholinergen Neurotransmitterhaushalt ein, indem sie die Acetylcholinesterase inhibieren oder die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren stimulieren [36]. Wirkstoffe wie Donepezil (Aricept®), Rivastigmin (Exelon®) und Galanthamin (Reminyl®) können Acetylcholindefizite bei einer leichten bis mittelschweren Demenz beheben [42]. Der wichtigste therapeutische Effekt der Cholinesterase-Inhibition ist die Stabilisierung der kognitiven Leistungen. Die Hälfte der so behandelten Patienten bleiben für ein Jahr auf ihrem kognitiven Niveau und bei 20% der Patienten gelingt dies sogar für zwei Jahre. Galanthamin verstärkt zusätzlich noch die intrinsische Aktivität von Acetylcholin an Nikotinrezeptoren. Dieser duale Mechanismus kann die Aktivität des cholinergen Systems steigern. Ein weiterer Effekt bei der Inhibition der Cholinesterase ist die Aktivierung der α -Sekretase, die das APP zu löslichen, nicht aggregierenden Fragmenten (sAPP) abbaut, damit die Anhäufung des β -Amyloid-Proteins und der Plaques verringert [43].

Ein weiterer Therapieansatz ist der Einsatz von Calciumantagonisten wie Nimodipin (Nimotop®), das den Calciumeinstrom in die Nervenzelle durch spannungsabhängige Calciumkanäle (L-Typ) hemmt. Bei Störung der Calciumhomöostase wird der Energiestoffwechsel verändert und der Anstieg der Calciumionen führt zu einer Aktivierung von Enzymen wie Kinasen, Phosphatasen, Proteasen, Lipasen und NO-Synthasen, die die Schädigung der Neurone verursachen. Nur ein Drittel der Patienten

sprechen auf dieses Medikament an. Die Wirkung ist nicht nur auf die Nervenzellen beschränkt und so müssen Patienten mit „Nebenwirkungen“ wie Blutdrucksenkung, Hautrötung, Hitzegefühl, Zunahme der Herzfrequenz, Magen-Darm-Beschwerden und peripheren Ödemen kämpfen.

Als pathogenetischer Faktor bei degenerativen Hirnerkrankungen ist also die Überladung von Nervenzellen mit Calciumionen anzusehen. Der NMDA-Rezeptor, ein Subtyp des Glutamatrezeptors, ist ein Calcium- und Natrium-Kanal, der insbesondere für den Calciumeinstrom in das Neuron verantwortlich ist. Der Wirkstoff Memantin (Ebixa[®]) als NMDA-Antagonist wirkt damit wesentlich selektiver [26,42]. Memantin ist derzeit das einzige Antidementivum, das für die Behandlung der mittelschweren bis schweren Alzheimer-Krankheit zugelassen ist.

Nootropika zeigen in klinischen Studien eine gewisse antidementive Wirkung. Sie haben positiven Einfluss auf die zerebrale Durchblutung und den Energiestoffwechsel des Hirnes. Wirkstoffe wie Piracetam (Avigilen[®]) oder Pyritinol (Ardeyceryl[®]) steigern den Glucosestoffwechsel und erhöhen den ATP-Umsatz zur Verbesserung der Hirnleistung. Die therapeutische Anwendung ist aufgrund der Nebenwirkungen und den fehlenden Vorteilen bezüglich anderer Antidementiva stark zurückgegangen.

Weitere Ansätze in der Therapie der Alzheimer-Krankheit sind Antioxidantien wie Vitamin E, Selegilin als MAO-B-Inhibitor, Anti-apoptotische Substanzen wie Caspasen [44], Anti- β -Amyloid Wirkstoffe, cholesterinsenkende Statine (APP, β - und γ -Sekretasen sind vorwiegend in cholesterinreichen Gebieten der Zellmembranen lokalisiert) oder Substanzen, die die Produktion von neurotrophen Faktoren anregen und damit die Degeneration der Neuronen verhindern (z.B. Leteprinim).

5.2. Alkoholismus

Ein weiteres Indikationsgebiet von Desoxypeganin könnte das grosse Gebiet der Suchterkrankungen darstellen, wobei Alkoholismus an erster Stelle zu nennen ist. Alkoholismus beschreibt eine chronische Krankheit, an deren Entstehung und Manifestation genetische, psychosoziale und umweltbedingte Faktoren beteiligt sein können. Diese Erkrankung verläuft häufig progressiv und tödlich und ist gekennzeichnet durch periodischen („Quartalsäufer“) und/oder kontinuierlichen („Spiegelsäufer“) Kontrollverlust beim Trinken, häufiges Denken an Alkohol, Anhalten des Konsums trotz Kenntnis der schädlichen Folgen (über 90 alkoholassoziierte Krankheiten) sowie Leugnen der schädlichen Folgen. Desweiteren kann langfristiger Alkoholkonsum soziale Störungen nach sich ziehen. Diese können sich in Form des Verlustes sozialer Verhaltensweisen äussern und vom Wegfall sozialer Anbindung, des Arbeitsplatzes und der Wohnung begleitet werden. Insgesamt sind die gesellschaftlichen und volkswirtschaftlichen Schäden aufgrund von Alkoholkonsum nur schwer zu ermitteln. Man schätzt die volkswirtschaftlichen Kosten allein für Deutschland auf ungefähr 20 Milliarden Euro pro Jahr. Dieser Gesamtverlust ergibt sich aus direkten und indirekten Kosten. Zum direkten Ressourcenverbrauch (knapp 7,9 Milliarden Euro) tragen hauptsächlich stationäre und ambulante Behandlungen und Rehabilitationen sowie Vorbeugung und Betreuung bei. Hier gehören aber auch die Kosten, die zum Beispiel durch Arbeitsunfälle, Sachschäden, Krankentransporte oder Verwaltungsausgaben und Forschung entstehen. Die indirekten Ressourcenverluste (über 12 Milliarden Euro) werden vor allem durch den Arbeitsausfall, die Frühberentung und den Tod erwerbstätiger Menschen bestimmt. Das sind ungefähr 1 –

3 % des Bruttosozialproduktes von Deutschland. Jährlich sterben ungefähr 42000 Menschen an den Folgen ihres Alkoholkonsums [45].

Die Grenzwerte für die tägliche Alkoholzufuhr, bei denen eine Gesundheitsgefährdung nicht mehr ausgeschlossen werden kann, liegt bei 20 g für Männer und 10 g für Frauen. In Zahlen ausgedrückt sind dies schätzungsweise 5,1 Millionen Frauen und 9,6 Millionen Männer im Alter von 18 – 79 Jahren, basierend auf Angaben zur Bevölkerungsdichte in Deutschland im Jahr 1998. In Deutschland wurde für das Jahr 2001 ein Pro-Kopf-Verbrauch an alkoholischen Getränken in Höhe von 152,8 l festgestellt, was umgerechnet 10,5 l reinem Alkohol pro Kopf und Jahr entspricht [46].

5.3. Nikotinabusus

Das Rauchen fällt einem wie der Alkoholismus bei dem Thema Suchterkrankungen sofort ein. Rund 24 Millionen Deutsche greifen täglich zur Zigarette. 80 % aller Raucher versuchen mindestens einmal im Leben mit dem Rauchen aufzuhören, wobei die Erfolgsrate nur bei 1 – 5 % liegt. Dabei ist Tabakkonsum nicht einfach nur „Macht der Gewohnheit“, sondern die körperlichen Faktoren spielen eine wichtige Rolle. Das Nikotin verursacht zwar keinen Rauschzustand wie etwa Alkohol, hat aber dennoch einen entscheidenden Einfluss auf die Stoffwechselvorgänge im Gehirn. Umstritten ist immer noch, wie hoch der Anteil der körperlichen Abhängigkeit bei der Nikotinsucht tatsächlich ist. Allein die durch Rauchen verursachten Lungenkrankheiten gehören zu den zehn häufigsten Todesursachen weltweit. Dazu zählen die chronische Bronchitis und der Lungenkrebs. Mit dem Rauchen werden auch zahlreiche andere Krebsarten wie Zungen-, Kehlkopf- und Mundhöhlenkrebs, Magen- und Darmkrebs sowie weitere gesundheitliche Risiken wie Gefäßverkalkung mit den Folgen Herzinfarkt und

Schlaganfall in Zusammenhang gebracht. In den 90-er Jahren zählte man 19 % aller Todesfälle in den USA zu den nikotinassoziierten Krankheiten, wobei Alkoholismus und andere nicht-nikotinische Drogenabhängigkeiten nur 6 % der Todesfälle ausmachten [47].

Nikotin besitzt die psychopharmakologischen Eigenschaften, die mit anderen psychostimulierenden Drogen wie Amphetamin und Kokain vergleichbar sind [48]. Der Zigarettenrauch dient dabei als Vehikel für das Nikotin. Er gelangt bei jeder Inhalation sofort in die Bronchien und erreicht nach nur 10 Sekunden das Gehirn [49]. Ein normaler Raucher mit durchschnittlich 10 Zigaretten pro Tag wiederholt diesen Inhalationsvorgang 500 - 700 Mal pro Woche.

5.3.1. Wirkung von Nikotin

In niedrigen Dosen wirkt Nikotin wie Acetylcholin ganglienerregend durch Depolarisation der postsynaptischen Membranen, was eine Ausschüttung von Catecholaminen (Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin) aus dem Nebennierenmark zur Folge hat. Durch Dauerpolarisierung kommt es bei hohen Dosen zur Ganglienblockade, damit zur Blutdrucksenkung, geringeren Catecholaminfreisetzung und Tonusverminderung des Magen-Darm-Kanals [26]. Nicotin besitzt sehr komplexe Effekte auf die Neurotransmitterfreisetzung im Hirn. Dabei wird besonderes Augenmerk auf die Rolle des mesolimbischen Dopamin-Systems gelegt. Die meisten Drogen stimulieren vorwiegend die Freisetzung von Dopamin im mesolimbischen System, was für das Abhängigkeitspotential verantwortlich gemacht wird [50]. Ebenfalls haben Studien gezeigt, dass Raucher eine reduzierte Konzentration an Serotonin im Hippocampus aufweisen [51].

5.4. Zusammenhang Nikotin / Alkohol / psychische Erkrankungen

Zwischen Rauchen und Alkoholkonsum besteht ein enger Zusammenhang. Besonders bemerkenswert sind Beobachtungen, dass bis zu 90 % aller abhängigen Alkoholkonsumenten rauchen, und dass Alkoholabhängigkeit bei Rauchern zehnmal häufiger auftritt als bei Nichtrauchern. Welches auch immer die biologischen Mechanismen sein mögen, so sind doch Rauchen und Alkoholkonsum oft in den gleichen gesellschaftlichen Situationen anzutreffen. Viele Studien haben deutlich gemacht, dass die grösseren gesundheitlichen Risiken durch den wechselseitigen Effekt von Tabakkonsum und Alkohol hervorgerufen werden [52]. Beide Substanzen, Ethanol und Nikotin, sind assoziiert mit der Freisetzung von Dopamin im mesolimbischen System durch Stimulierung der cholinergen Neuronen [53,54]. Studien haben ergeben, dass abstinente Alkoholiker, die rauchen, eine geringere Rückfallquote aufweisen. Wenn also das Alkohol-Craving in Zusammenhang gebracht werden kann mit dem „Verbrauch“ von Dopamin oder endogenen Opiaten, dann verringert das Rauchen dieses Verlangen durch Freisetzung dieser Substanzen im Hirn [53,55].

12 – 15 % der Bevölkerung leiden an psychischen Erkrankungen. Davon rauchen 40 % der Patienten und 30 % der Raucher in den USA haben psychische Probleme [56,57,58]. Bis zu 80 % der chronisch schizophrenen Patienten rauchen [59]. Das Niveau der nikotinischen Rezeptoren ist bei der Schizophrenie geringer ausgeprägt und die Exprimierung des α_7 -Subtypus ist in allen Bereichen des Gehirns vermindert.

Die Interaktionen von Alkohol und Nikotin mit dem Neurotransmitterhaushalt, vorwiegend auf die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren und die Freisetzung von Dopamin, Serotonin und Acetylcholin bezogen, sind von sehr komplexer Art. Es gestaltet sich sehr schwierig, alle Effekte wissenschaftlich eindeutig zu erklären und

eine erfolgversprechende Therapie vorzuschlagen. Sinnvoll ist ein cholinerges Wirkstoff, der die nikotinische Rezeptorfunktion moduliert, den Abbau der Catecholamine verlangsamt und dadurch das Alkohol- oder Nikotin-Craving vermindert. Ein Beispiel für einen solchen Wirkstoff ist Galanthamin, der bei der Alzheimer-Krankheit schon angewandt wird. Er zählt zu den allosterischen Modulatoren der nikotinischen Rezeptoren und inhibiert die Acetylcholinesterase [60]. Dieser Wirkstoff wurde auch schon in der Behandlung der Schizophrenie getestet und ergab mit einer kleinen Zahl an Patienten gute Erfolge [61,62].

Nach den eben beschriebenen Therapieansätzen wird deutlich, dass für Desoxypeganin (3) mit seinem dualen Wirkmechanismus einige Indikationsgebiete denkbar wären. Für welche Hauptindikation der Arzneistoff letztendlich in Frage kommt, hängt auch von der Durchführbarkeit der Studien am Patienten ab. Die Indikation Alzheimer-Krankheit und der Erfolg eines Arzneistoffes am Patienten während der Therapie ist relativ schwer nachzuweisen. Die Studien gestalten sich zeitaufwändig und damit kostenintensiv. Studien für die Indikation Nikotin- und Alkoholabusus hingegen sind sehr einfach durchzuführen und der Erfolg weniger Rauchen oder weniger Trinken ist einfach festzustellen.

6. Synthese von Desoxypeganin

Bei der Synthese von Desoxypeganin (3) wurden Ziele verfolgt wie: einfache Versuchsanordnung, der Einsatz kostenarmer Edukte, die Vermeidung von chlorierten Lösungsmitteln, die Umgehung von kostenintensiven Reinigungsschritten wie Destillation und ausserdem sollte jeder Syntheseschritt innerhalb von weniger als einem

Arbeitstag (8 h) durchführbar sein. Da man oft von der Natur lernen kann, wurde zunächst der Biosyntheseweg auf Verwendbarkeit näher betrachtet.

6.1. Biosynthese von Chinazolin Alkaloiden in Peganum harmala

Untersuchungen mit radioaktiv markierten Ausgangssubstanzen haben ergeben, dass Chinazolin-Alkaloide in Peganum harmala aus Anthranilsäure und Putrescin, einem Decarboxylierungsprodukt von Ornithin, gebildet werden (Abb. 5). Dabei wird Anthranilsäure vorwiegend über den Shikimat-Weg von der Pflanze hergestellt [63].

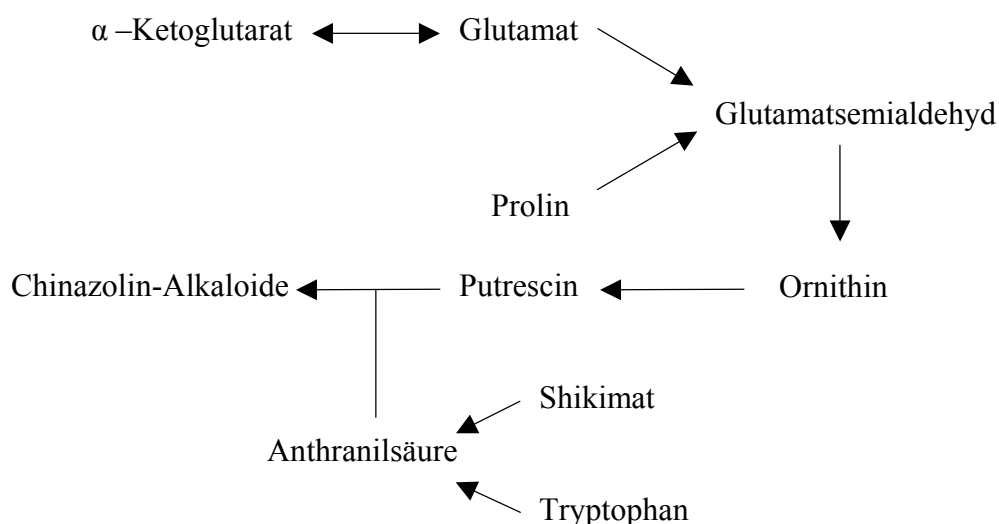


Abb. 5: Biosyntheseweg Chinazolin-Alkaloide in Peganum harmala nach [63].

6.2. Synthese der Zwischenstufe Pegenon

In der Literatur sind einige Synthesen für Chinazolinone bzw. für Pegenon (6) beschrieben, an denen man sich orientieren konnte. Als Edukte wurden entweder Anthranilsäure, Isatosäureanhydrid oder Anthranilamid und 2-Pyrrolidinon oder

Bernsteinsäureanhydrid verwendet. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass man bei biologisch wichtigen Heterocyclen gute Ergebnisse mit cyclischen Anhydriden und Imiden erzielen kann [64,65]. Alle beschriebenen Synthesen liefern akzeptable Ausbeuten, beinhalten teils aber doch erhebliche Nachteile für eine Grossproduktion in der Industrie. In den dreissiger Jahren synthetisierten die deutschen Chemiker Späth und Platzer Pegenon aus Isatosäureanhydrid und 2-Pyrrolidinon [66]. Die Reinigung des Produktes erfolgte durch Destillation im Hochvakuum, was in einem grösseren Maßstab einen nahezu unmöglichen Arbeitsschritt darstellt. Russische Wissenschaftler hingegen arbeiteten mit Anthranilsäure, Thionylchlorid (oder Phosphortrichlorid oder Phosphoroxychlorid) und 2-Pyrrolidinon und grossen Mengen Toluol als Lösungsmittel. Die Zwischenstufe konnten sie nur durch Ausschütteln mit Chloroform isolieren [67,68,69]. Chlorierte Kohlenwasserstoffe und organische Lösungsmittel wie Toluol werden von der „European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA)“ zu den Lösungsmitteln der Klasse 2 gerechnet. Diese sind zwar nicht genotoxisch, aber dennoch bei der Arzneimittelherstellung zu limitieren, da sie als ursächliche Reagenzien für irreversible Schädigungen wie neurotoxische Effekte oder Teratogenität zu beurteilen sind. Dabei werden Konzentrationsgrenzen von Chloroform im pharmazeutischen Produkt von weniger als 60 ppm und bei Toluol von weniger als 890 ppm gefordert. Diese Grenzen werden im Allgemeinen mit gaschromatographischer Analytik bestimmt [70]. Wegen des dafür nötigen hohen apparativen Aufwandes versucht man, soweit es geht auf diese Lösungsmittel zu verzichten.

Das Edukt 2-Pyrrolidinon (5) wird gelegentlich als Lösungsmittel in organischen Synthesen verwendet und ist zudem Reaktionspartner für die Herstellung von Pegenon (6) (Abb. 6 a). Daraus entstand die Idee, Isatosäureanhydrid (4) in 2-Pyrrolidinon (5) zu

lösen und direkt in diesem Lösungsmittel unter Temperatureinfluss reagieren zu lassen. Unter Decarboxylierung und Wasserabspaltung kommt es durch cyclische Kondensation zur Bildung von Pegenon (6). Nach Abkühlen kristallisiert Pegenon (6) in langen Nadeln aus.

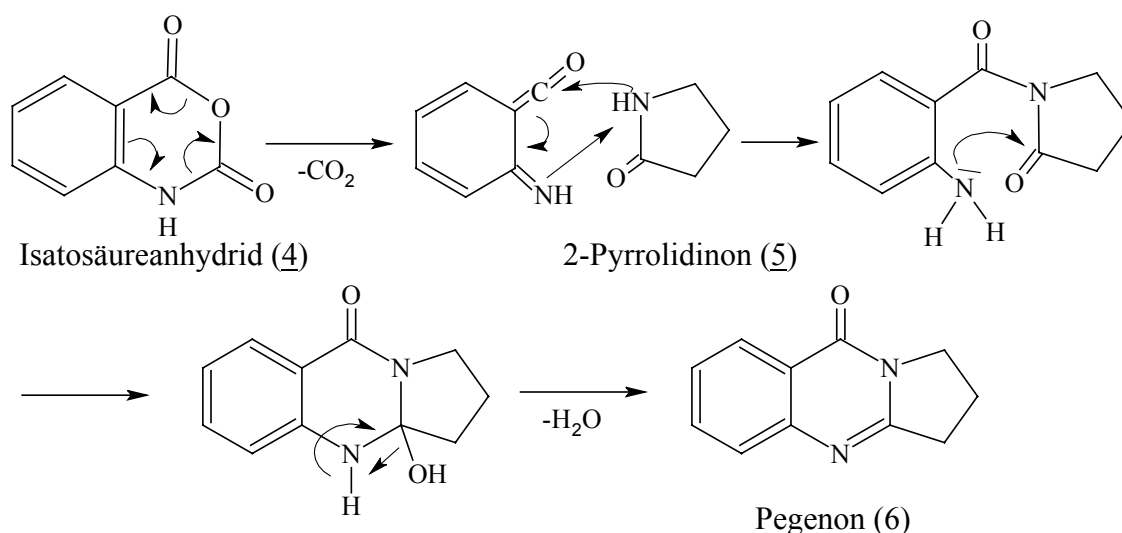


Abb. 6 a: Reaktionsmechanismus für die Synthese der Zwischenstufe 6.

Der Überschuß an 2-Pyrrolidinon (5) spielt dabei eine sehr grosse Rolle. Isatosäureanhydrid (4) neigt bei zu grosser Konzentration zur Selbstkondensation und es bilden sich polymere Strukturen wie das Trimer und Tetramer der Anthranilsäure [71]. Andererseits muss der Überschuß an 2-Pyrrolidinon (5) so gering wie möglich gewählt werden, da 5 ein sehr gutes Lösemittel für Pegenon (6) darstellt. Das überschüssige Lösungsmittel sowie darin gelöste Nebenprodukte, die bei der Reaktion entstehen, können durch Abgiessen von den Kristallen entfernt werden. Dabei entsteht eine Reinheit der Kristalle von 80 – 85 % (m/m) Pegenon (6). Der Rest ist anhaftendes 2-Pyrrolidinon (5), das leicht wasserlöslich ist und bei der anschließenden Clemmensen-Reduktion nicht stört. Diese Reinheit reicht zur Weiterverarbeitung für den folgenden

zweiten Syntheseschritt, nämlich die Reduktion zu Desoxypeganin (3), vollkommen aus. Mit diesem Verfahren konnte man Prozesse wie Destillation und die Verwendung von chlorierten Lösungsmitteln vermeiden.

6.3. Clemmensen-Reduktion von Pegenon zum Desoxypeganinkomplexsalz

E. Clemmensen konnte 1913 erstmals Ketone und Aldehyde mit amalgamiertem Zink und Salzsäure zu gesättigten Kohlenwasserstoffen reduzieren [72]. Die nach ihm benannte Clemmensen-Reduktion stellt eine der leistungsfähigsten Reduktionen in organischen Synthesen dar. Im Allgemeinen werden unter diesen Bedingungen Nebenprodukte wie Alkohole oder Dimerisierungsprodukte wie Pinakole vermieden [73]. Der Reaktionsmechanismus ist immer noch nicht vollständig aufgeklärt. Allerdings werden in der Literatur verschiedene Möglichkeiten vorgestellt. Es gilt als gesichert, dass diese Reaktion an der Grenzfläche des Zinks stattfindet, Zink dabei als „Elektronenspender“ fungiert (Übergang von zwei Elektronen) und sich ein Organozinkkomplex mit dem Substrat ausbildet [73,74]. Das amalgamierte Zink greift also in die Reaktionskinetik der Reduktion direkt ein, indem seine Oberfläche modifiziert wird [75,76]. Die Amalgamierung der Zinkoberfläche erhöht seine Aktivität, da sich so das Abscheidungspotential des Wasserstoffes vergrößert. Die Verwendung von Quecksilber in einer Arzneistoffsynthese ist aus Toxizitätsgründen ausgeschlossen. Deshalb wurde lediglich reines, nicht amalgamiertes Zinkpulver verwendet. Richtschnur waren ältere Vorschriften [66,77]. Lediglich durch Veränderungen der Mengen an Essigsäure, Salzsäure und Zink, sowie der Reaktionsdauer wurde die Reduktion optimiert.

Sicherlich wird im Säuren die Carbonylfunktion des protonierten Pegenons (6) protoniert und es kommt an der Zinkoberfläche zu einem Elektronentransfer bei dem ein Organo-Zink-Intermediat (A) entsteht (Abb. 6 b).

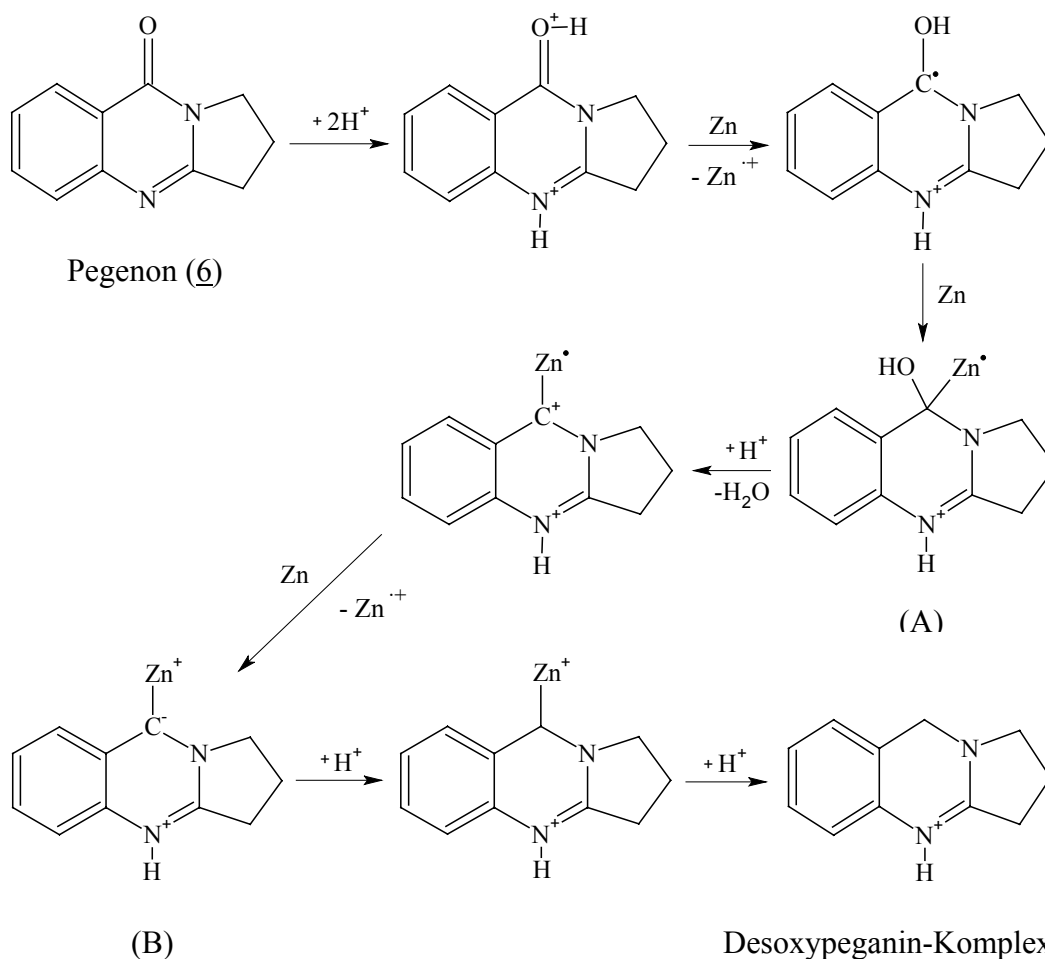


Abb. 6 b: Schema der Clemmensen Reduktion vom Pegenon (6) zum Desoxypeganin-Komplexsalz nach [73].

Aus einer weiteren Protonierung von (A), gefolgt von Wasserabspaltung und schrittweisem Elektronentransfer kommt es zur Bildung eines Zwitterions (B). Die Methylengruppe von Desoxypeganin (3) resultiert letztendlich durch Protonierung von (B) und einem Austausch eines weiteren Protons durch Zink. Insgesamt werden also vier Elektronen vom Zink geliefert. Das reduzierte Produkt kristallisiert als

Desoxypeganintetrachlorozinkat aus. Dieses Komplexsalz, welches sich mit Zinkchlorid bildet, ist in der Literatur beschrieben [78-82].

6.4. Aufrahmen der Base Desoxypeganin

Das Ziel war eine Freisetzung der Base aus dem Komplexsalz ohne einen Ausschüttelvorgang mit organischen Lösungsmitteln durchführen zu müssen. Der Vorgang des Aufrahmens umgeht das Ausschütteln, indem gelöstes Desoxypeganintetrachlorozinkat alkalisiert wird. Durch den stark exothermen Neutralisationsvorgang bringt man die freie Base zum Schmelzen und es kommt aufgrund der geringeren Dichte zum Aufrahmen. Desoxypeganin (3) kann dann entweder flüssig abgehebert oder nach Erkalten wie eine Art „Deckel“ abgehoben werden. In der Mutterlauge entstehen aus dem Komplexsalz durch die Alkalisierung mit Natriumhydroxid grosse Mengen an basischem Zinkchlorid [83]. Dieses Verfahren ermöglicht eine Trennung der Base Desoxypeganin (3) von den anorganischen Bestandteilen auf eine sehr einfache Weise. Eine Umkristallisation mit demineralisiertem Wasser ergibt die Base Desoxypeganin (3) mit einem halben Kristallwasser [84].

6.5. Alternative Syntheseveruche

6.5.1. Verwendung von anorganischen Salzen

Bei der Synthese der Zwischenstufe Pegenon (6) wurden Versuchsreihen mit anorganischen Chloriden (NH_4Cl , CaCl_2 , MgCl_2) und Sulfaten (CaSO_4 , Na_2SO_4 ,

MgSO₄, ZnSO₄) durchgeführt. Dabei wurden katalytische Mengen der Salze eingesetzt, um Reaktionsdauer oder Temperatur zu beeinflussen oder durch Einsatz von grösseren Mengen das entstehende Wasser zu binden und so die Ausbeute der Produkte zu erhöhen. Der Zusatz von diesen Salzen bewirkten allerdings keinen positiven Effekt auf die Reaktion, vielmehr wurde der Reaktionsansatz damit verunreinigt.

6.5.2. Verringern des Lösungsmittels 2-Pyrrolidinon

Es ist möglich, das Lösungsmittel und Edukt 2-Pyrrolidinon (5) in einem äquimolaren Verhältnis zu verwenden und Isatensäureanhydrid (4) bei höherer Temperatur einzutragen. Dabei entsteht nach Abkühlen eine glasartige feste Masse, die man zur Isolierung von Pegenon (6) noch weiter aufarbeiten muss. Der Vorteil dieser Variante ist die Einsparung des Eduktes 2-Pyrrolidinon (5) und das Vorliegen der Base nach Aufarbeitung in einer hohen Reinheit. Die Nachteile sind die geringere Ausbeute sowie der grössere apparative Aufwand im Vergleich zu der in Kapitel 6.2., Theoretischer Teil, beschriebenen Synthese. Dieses Verfahren ist nur im Labormaßstab sinnvoll. Weitere Möglichkeiten der Aufarbeitung mit Flash-Säulen gefüllt mit Aktivkohle oder Kieselgel erbrachten keine befriedigenden Resultate bezüglich des Arbeitsaufwandes.

6.5.3. Clemmensen-Reduktion mit Schwefelsäure

Die Clemmensen-Reduktion kann auch mit Schwefelsäure anstelle von Salzsäure durchgeführt werden [68]. Dabei muss mit verdünnter Schwefelsäure (10 – 40 %) gearbeitet werden, um die Entstehung von freiem Schwefel zu vermeiden. Konzentrierte Schwefelsäure kann durch Zink reduziert werden und Schwefeldioxid bzw. freien

Schwefel bilden [85]. Es ist in der Literatur kein Komplexsalz mit Schwefelsäure und Desoxypeganin (3) beschrieben, und das entstehende Produkt fällt nicht aus wie das Desoxypeganintetrachlorozinkat. Dadurch muss bei der Basenfreisetzung das gewünschte Produkt sowie die komplette Mutterlauge (gelöstes Produkt und gelöstes Zinksulfat) alkalisiert werden. Bei der Alkalisierung mit Natronlauge entstehen grosse Mengen an basischem Zinksulfat [86,87]. Das Freisetzen der Base erfolgt wie in Kapitel 6.4., Theoretischer Teil, beschrieben.

6.6. Zusammenfassung der Synthese

Es konnte eine einfache Synthese entwickelt werden, die aufwändige Arbeitsschritte wie Destillation und Ausschüttelvorgänge vermeidet. Durch einfaches Filtrieren und Dekantieren ist es jeweils möglich, Kristalle zu isolieren und direkt weiterzuverarbeiten. In der Synthese von Pegenon (6) benötigt man kein zusätzliches Lösungsmittel, sondern löst Isatosäureanhydrid (4) direkt in seinem Reaktionspartner. Die Edukte, vor allem die der Clemmensen-Reduktion, sind für eine organische Synthese kostenarm. Das überschüssige Zink kann nach Filtration wieder in der Zinkhütte aufgearbeitet werden. Das Aufrahmen der Base Desoxypeganin (3) und die daraus resultierende Trennung von anorganischen Salzen ist eine sehr elegante und einfache Methode. Die abschliessende Kristallisation erfolgt in demineralisiertem Wasser. So konnte die Verwendung von organischen Lösungsmitteln völlig vermieden werden. Die in Kapitel 6.3., Theoretischer Teil, beschriebene salzsaure Mutterlauge kann mit der basischen Mutterlauge aus Kapitel 6.4., Theoretischer Teil, neutralisiert werden und es entstehen im Wässrigen gelöste anorganische, nicht toxische Salze. Diese Vorteile sind auch bezüglich dem Umweltgedanken vor allem bei der Grosssynthese in der Industrie

beachtlich. Zusätzlich kann jeder Syntheseschritt an nur einem Arbeitstag durchgeführt werden. Das hier beschriebene Syntheseverfahren konnte zum Patent angemeldet werden. Zu diesem Zeitpunkt liegt noch keine Offenlegungsschrift vor. Die selbstgesteckten Ziele konnten demnach alle erfüllt werden.

7. Verhalten von Desoxypeganin gegenüber Oxidantien

Ein wichtiges Kriterium für die Charakterisierung eines Arzneistoffes ist das Verhalten gegenüber Sauerstoff. Die Oxidation eines Arzneistoffes spielt eine grosse Rolle bei Fragen zur Stabilität, Haltbarkeit und Lagerung. Gelangt ein Xenobioticum in den Körper, wird dieses durch eine Vielzahl von Enzymen metabolisiert. Dabei spielen oxidative Prozesse eine grosse Rolle. Je nachdem ob der Arzneistoff oder ein Metabolit die wirksame Verbindung darstellt, sind Veränderungen am Arzneistoffmolekül erwünscht oder nicht. Für die Metabolisierung ist die Wahl der Darreichungsform entscheidend. Insbesondere ist die Umgehung des „First-Pass-Effekts“ oft notwendig. In-vitro Versuche mit oxidierenden Reagenzien, die Trennung der dabei entstehenden Substanzen mit Hilfe präparativer HPLC und die Strukturaufklärung durch z. B. Kernresonanz- und Massenspektroskopie stellen einen sehr wichtigen Teilabschnitt für die umfassende Betrachtung eines Arzneistoffes dar. Das Hauptanliegen ist dabei, möglichst viele analytische Informationen zu sammeln, um sie später z.B. bei Auswertungen von in-vivo Versuchen anwenden zu können.

7.1. Herstellung und Charakterisierung von Oxidationsprodukten

Bei der Oxidation eines Dihydrochinazolins wie Desoxypeganin (3) oder eines Chinazolinons wie Pegenon (6) erwartet man N-Oxide [88,89]. Diese beiden N-Oxide werden in der Pflanze biosynthetisch hergestellt und konnten von russischen Wissenschaftlern auch isoliert und analytisch erfasst werden [90,91]. Eine Oxidation von Desoxypeganin (3) zu Pegenon (6) mit Wasserstoffperoxid ist ebenfalls schon beschrieben worden [77], so dass man sich an diesen Informationen orientieren konnte. Es gibt verschiedene Reagenzien, um eine Oxidation bei tertiären Aminen, Amidinen, Anilinen oder heterocyclischen aromatischen Aminen zu erreichen. Zunächst wäre hier das Dimethyldioxiran (DMD) zu nennen, welches aus Aceton und Kaliumhydrogenperoxomonosulfat (Monokalium-Salz der Caroschen Säure) in situ hergestellt werden muss [92-94]. Die Ausbeute beträgt dabei nur 5 % und kam für unsere präparativen Zwecke nicht in Frage. Weitere Reagenzien sind Bis(trimethylsilyl)peroxide (BTSP) [95,96] oder ein Methyltrioxorhenium/Wasserstoffperoxid System [97]. Beide Reagenzien erfordern einen gewissen apparativen Aufwand. Deshalb fiel die Entscheidung zunächst auf handelsübliche Reagenzien wie m-Chlorperbenzoesäure und Wasserstoffperoxid. Die m-Chlorperbenzoesäure ist zu einem Drittel mit m-Chlorbenzoesäure „verunreinigt“ und eine Reinigung durch einfaches Waschen mit einem Puffer pH 4,7 erbrachte keine zufriedenstellende Qualität [98]. Theoretisch sollte die m-Chlorbenzoesäure mit einem pK_a -Wert von 3,83 im Gegensatz zur Persäure (pK_a -Wert 7,14) bei einem pH-Wert von 4,7 vollständig ionisiert und wasserlöslich vorliegen. Weitere Reinigungen mit basischem Aluminiumoxid, an dem die saurere m-Chlorbenzoesäure adsorbieren sollte, schlugen fehl. Die Verwendung des unaufgearbeiteten Reagenzes in Chloroform ergab

keinerlei Oxidation [99]. Dies konnte nach Abziehen des Lösungsmittels kernresonanzspektroskopisch bestimmt werden. Die Vermutung liegt nahe, dass in diesem Fall die Base Desoxypeganin (**3**) mit m-Chlorbenzoesäure ein stabiles Salz gebildet hat, das in Chloroform unlöslich ist und sich deshalb der Oxidation entzieht.

Weitere Oxidationsbedingungen stellen die Verwendung von Wasserstoffperoxid in einem sauren Lösungsmittel wie Ameisensäure [100] oder Eisessig [101] dar. Desoxypeganin (**3**) wurde in Eisessig gelöst und bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von insgesamt der doppelten molaren Menge an Wasserstoffperoxid über mehrere Tage. Nach einwöchiger Reaktionszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde das überschüssige Lösungsmittel entfernt. Zur Aufklärung der Oxidationsprodukte wurde dieser einrotierte „Oxidationsansatz“ verwendet.

7.2. Analytik des Oxidationsansatzes

Die Trennung der Oxidationsprodukte erfolgte per HPLC auf Umkehrphase (Methode **A1**, Abb. 7). Nach Optimierung der mobilen Phase wurde in den präparativen Maßstab übertragen. Die präparative Säule enthielt die gleiche stationäre Phase wie die analytische Säule. Die einzelnen Fraktionen wurden gesammelt und das Lösungsmittel entfernt. Die Strukturermittlung der drei Hauptsubstanzen erfolgte mit der Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie), Infrarot- und UV-Spektroskopie sowie Massenspektroskopie, zum Teil unter Zuhilfenahme von Referenzsubstanzen.

0 - 0.9AU

225 nm

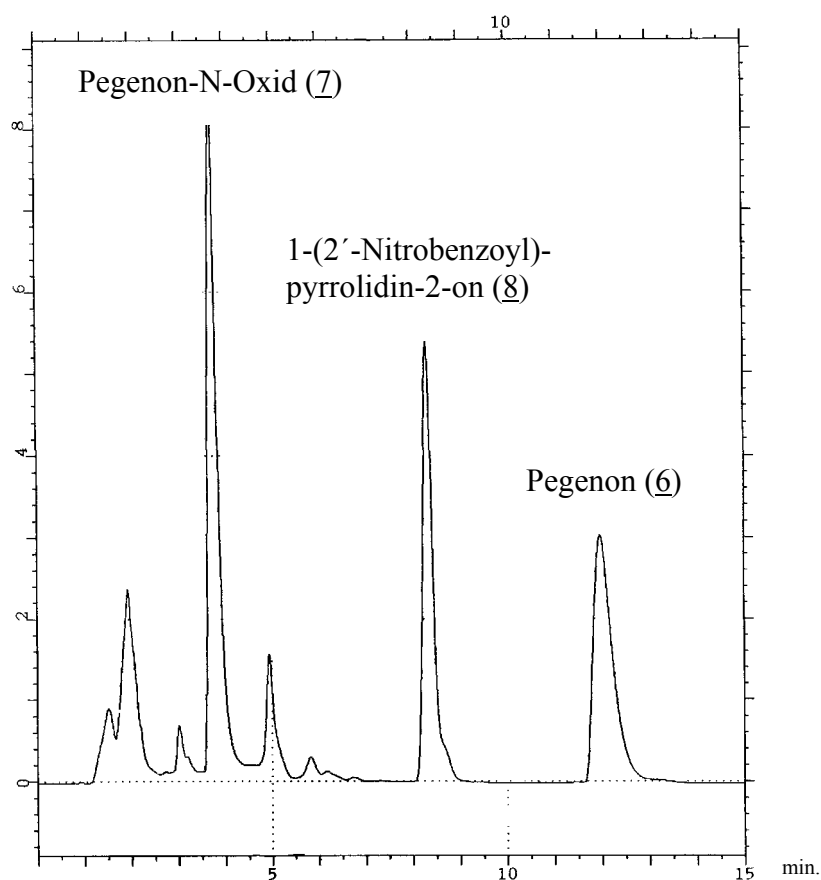


Abb. 7: Analytische HPLC des Oxidationsansatzes (Methode A1).

7.3. Strukturaufklärung der Oxidationsprodukte

Von den drei Hauptsubstanzen konnte die Verbindung mit einer Retentionszeit von 12 Minuten (Abb. 7) durch Vergleich der NMR-Spektren dem Pegenon (6) zugeordnet werden. Im Folgenden wird zunächst auf die Ausgangssubstanz Desoxypeganin (3) eingegangen, dann auf dessen Oxidationsprodukt Pegenon (6). Die Diskussion erfolgt dabei vorwiegend anhand der ^1H -NMR-Spektren.

Das Protonenresonanzspektrum von Desoxypeganin (3) (Abb. 8) zeigt hochfeldig die Protonensignale des alicyclischen Ringes. Das Proton an C-2 koppelt mit 4 benachbarten Wasserstoffkernen zu einem Quintett bei $\delta = 1,97$ ppm. Die Protonen an

C-1 und C-3 werden jeweils in Triplets aufgespalten, wobei die Protonen der dem Stickstoff benachbarten Methylengruppe bei 3,27 ppm und die anderen bei 2,52 ppm zur Resonanz kommen. Das Singulett bei 4,48 ppm lässt sich den beiden Protonen an C-9 zuordnen. Von den aromatischen Protonen zeigt H-6 als Triplett bei 7,09 ppm die tieffeldigste Lage gefolgt von H-7 (t) bei 6,93 ppm. Die beiden Dubletts von H-5 und H-8 liegen in der chemischen Verschiebung nur eine Kopplungskonstante auseinander, so dass als Signal ein Triplett bei 6,88 ppm resultiert. Der Schmelzpunkt von 86°C [84,91] sowie der Moleküllionenpeak von m/z 173 einer ESI-massenspektroskopischen Messung bestätigt die Struktur von Desoxypeganin (3).

Betrachtet man das ^1H -NMR-Spektrum des Pegenon (6) (Abb. 8), fällt sofort die paramagnetische Verschiebung der Kernresonanzsignale im aromatischen Bereich auf. Alle vier Protonenresonanzsignale des Aromaten sind getrennt voneinander zu erkennen und die Abfolge der Signale ändert sich im Vergleich zum ^1H -NMR-Spektrum des Desoxypeganins (3). Die stärkste Verschiebung um 1,2 ppm zu tiefem Feld ist aufgrund der Nähe zur Carbonylgruppe am Proton des C-8 zu erkennen ($\delta = 8,1$ ppm). Das benachbarte Proton an C-7 (t) kann über den Dacheffekt dem Signal bei $\delta = 7,42$ ppm zugeordnet werden. Das Proton an C-6 (t) zeigt eine chemische Verschiebung von 7,75 ppm und das an C-5 (d) von 7,53 ppm.

Durch die Oxidation an C-9 entfällt das Protonenresonanzsignal bei $\delta = 4,48$ ppm. Die Carbonylgruppe bewirkt auch die Verschiebungen der Protonen im alicyclischen Bereich. Dabei sind die Protonen an C-1 um knapp 0,9 ppm tieffeld verschoben und liegen jetzt bei $\delta = 4,13$ ppm. Das Triplett bei $\delta = 3,11$ ppm kann den Protonen an C-3 und das Quintett bei $\delta = 2,23$ ppm den Protonen an C-2 zugeordnet werden.

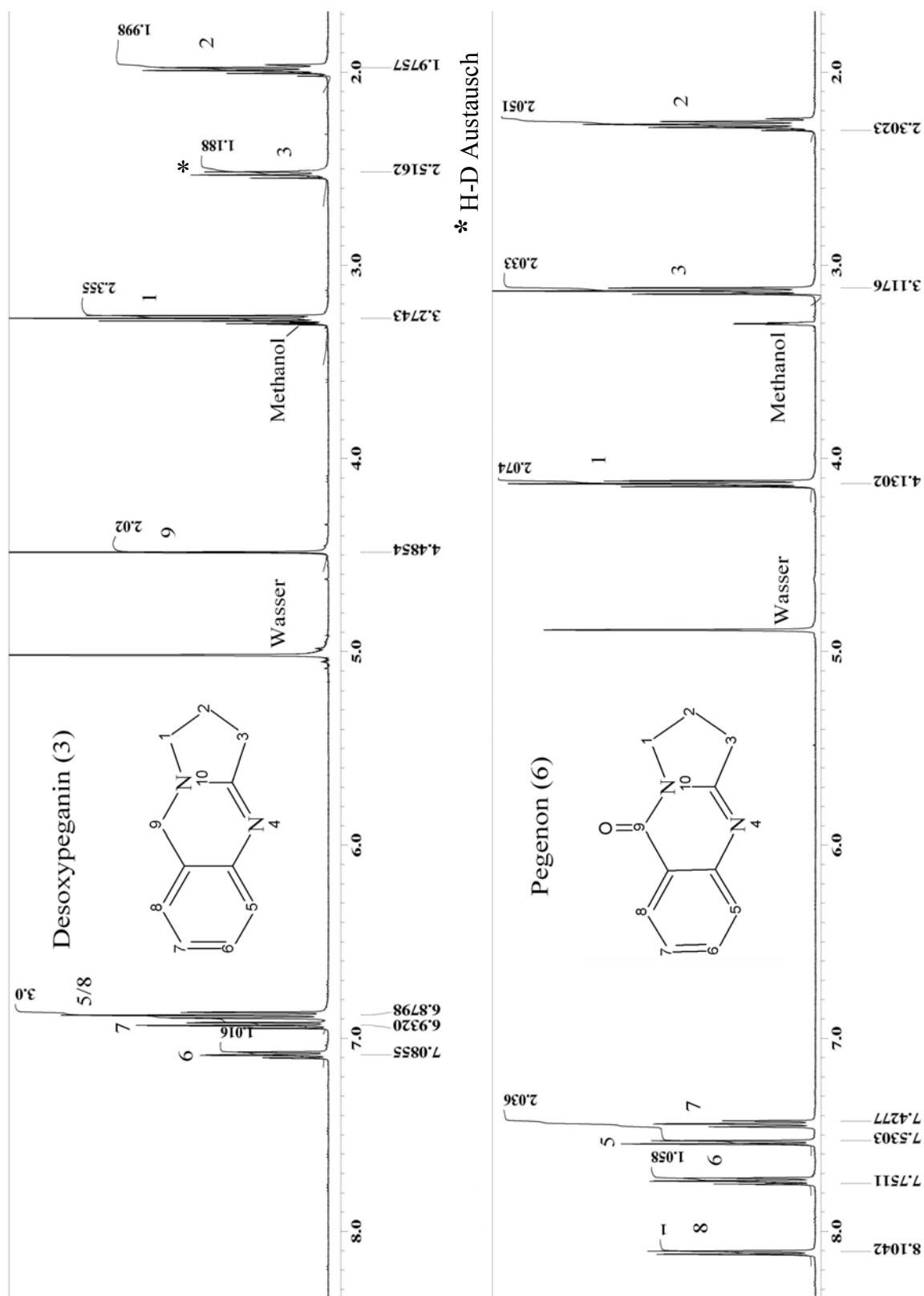


Abb. 8: ^1H -NMR Spektren der Verbindungen Desoxypeganin (3) und Pegenon (6) in $\text{Methanol-}d_4$, 500 MHz.

Das ESI-Massenspektrum zeigt einen Molekülionenpeak von m/z 187 und der Schmelzpunkt von 110°C stimmt mit den Literaturangaben von Pegenon (6) überein [91]. Hinzu kommt im IR-Spektrum noch das Auftreten einer weiteren Bande bei einer Wellenzahl von 1676 cm^{-1} . Diese starke Valenzschwingung einer CO-Doppelbindung im Bereich zwischen 2000 und 1600 cm^{-1} bestätigt die Identität von Pegenon (6) [102].

Für die Strukturaufklärung der zweiten Hauptsubstanz (Abb. 7; Retentionszeit 8 Minuten) waren die Massenbestimmung und das IR-Spektrum sehr wichtig. Das ESI-Massenspektrum ergab einen Molekülionenpeak von m/z 235. Der Massenunterschied zum Pegenon (6) beträgt 48. Das spricht für drei zusätzliche Sauerstoffatome zur Summenformel der Grundstruktur Pegenon (6). Die Interpretation des IR-Spektrums liefert zwei Carbonylbanden bei 1745 und 1685 cm^{-1} .

Zusätzlich traten noch weitere Banden bei 1518, 1346 und 860 cm^{-1} auf. Laut Literatur [103] sind diese charakteristisch für eine Nitro-Gruppe. Dabei kann die Bande bei 1518 cm^{-1} einer asymmetrischen Valenzschwingung zugeordnet werden. Die Bande bei 1346 cm^{-1} wird sogar noch in diesem Wellenzahlbereich zu den symmetrischen Valenzschwingungen gerechnet, bedingt durch die Planarität der Nitro-Gruppe.

Der Vergleich der Protonenresonanzspektren (Abb. 9) zeigt die gleiche Anzahl an Wasserstoffatomen und die gleichen Aufspaltungen der Signale. Die Protonen können demnach nicht anders im Molekül angeordnet bzw. verteilt sein. Diese Informationen sprechen für eine ringoffene Struktur mit einer Nitro-Gruppe und zwei Carbonylgruppen. Die Substanz wird als 1-(2'-Nitrobenzoyl)pyrrolidin-2-on (8) bezeichnet. Die Zuordnung der einzelnen Protonen ist der Abbildung 9 zu entnehmen.

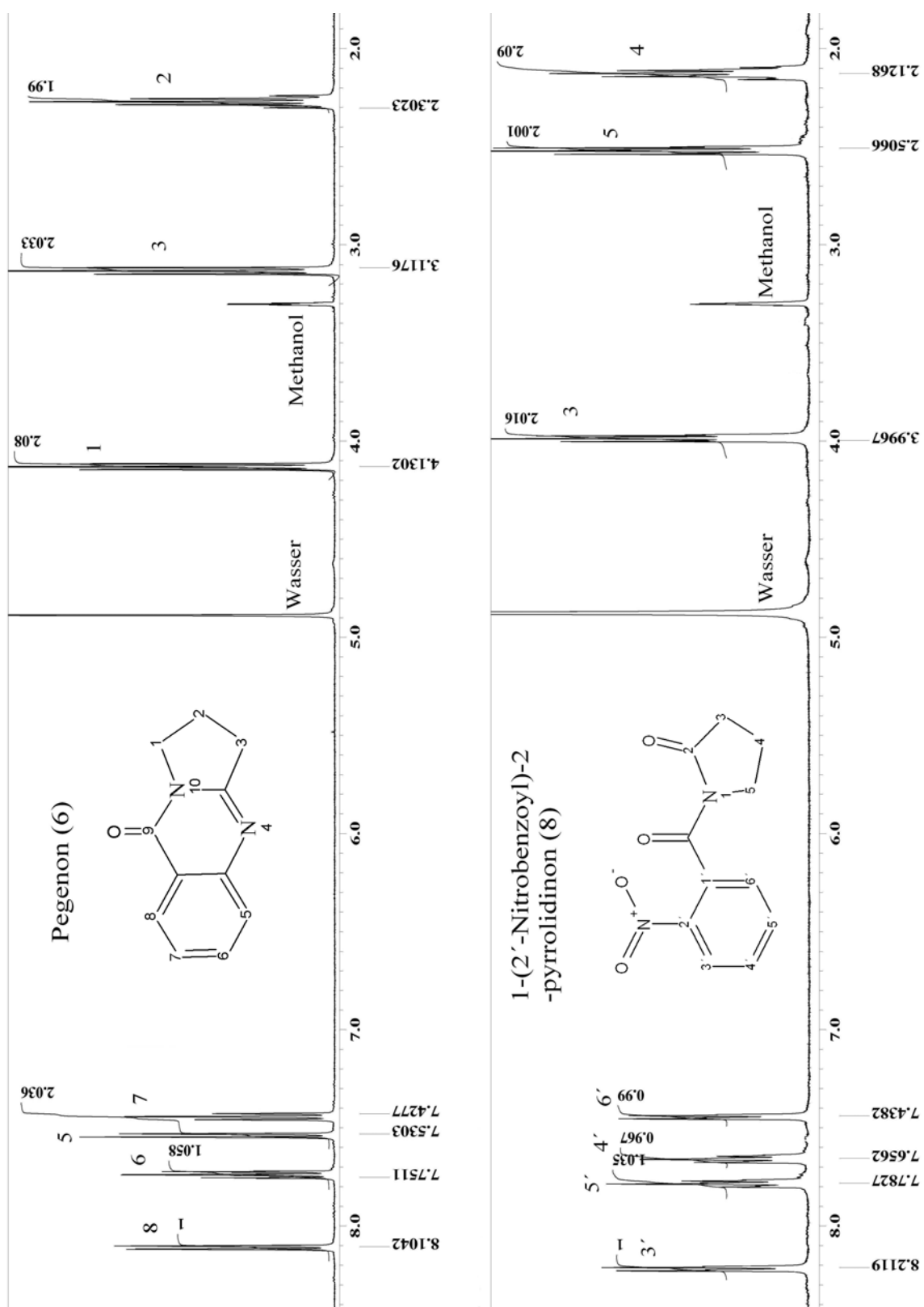


Abb. 9: $^1\text{H-NMR}$ Spektren der Verbindungen Pegenon (6) und 1-(2'-Nitrobenzoyl)-pyrrolidin-2-on (8) in $\text{Methanol-}d_4$, 500 MHz.

Die dritte Haupts substanz (Abb. 7; Retentionszeit 4 Minuten) zeigt im Protonenresonanzspektrum (Abb. 10) sehr interessante paramagnetische Verschiebungen. Die Aufspaltungen sowie die Integrale stimmen mit denen des ^1H -NMR-Spektrums von Pegenon (6) überein. Dadurch kann man eine Substitution an einem Kohlenstoffatom ausschliessen. Die Bestimmung der Masse (ESI-Massenspektrometrie) zeigt einen Molekülionenpeak von m/z 203 und unterscheidet sich damit vom Pegenon (6) um eine zusätzliche Masse von 16. Die Oxidation eines tertiären Amins zu einem N-Oxid ist bekannt und es gibt viele Arzneistoffbeispiele in der Literatur wie das Galanthamin-N-Oxid [104], Selegilin-N-Oxid [105], Zolmitriptan-N-Oxid [106] und Clozapin-N-Oxid [107,108]. Diese N-Oxide zeigen in der NMR-Spektroskopie starke Verschiebungen der Resonanzsignale an den benachbarten Kernen [109-112].

Durch die geänderte Ladungsdichte an N-4 und die magnetische Anisotropie der NO-Gruppierung kommt es vor allem bei den benachbarten Protonen an C-5 und C-3 zu einem entschirmenden Effekt mit einer paramagnetischen Verschiebung. Dabei rutscht das Kernresonanzsignal von C-5 um fast 0,8 ppm tieffeldig auf $\delta = 8,3$ ppm.

Das Kernresonanzsignal der Protonen an C-3 ändert sich um knapp 0,4 ppm und kann dem Triplet mit der chemischen Verschiebung von $\delta = 3,51$ ppm zugeordnet werden. Eine starke Tieffeldverschiebung ist noch am Proton an C-7 von über 0,5 ppm auf $\delta = 8,0$ ppm zu beobachten. Dieser starke Effekt kann durch die Alternanz der Ladung ausgehend von der NO-Gruppierung erklärt werden. Die restlichen Kernresonanzsignale im aromatischen Bereich konnten über den Dacheffekt zugeordnet werden.

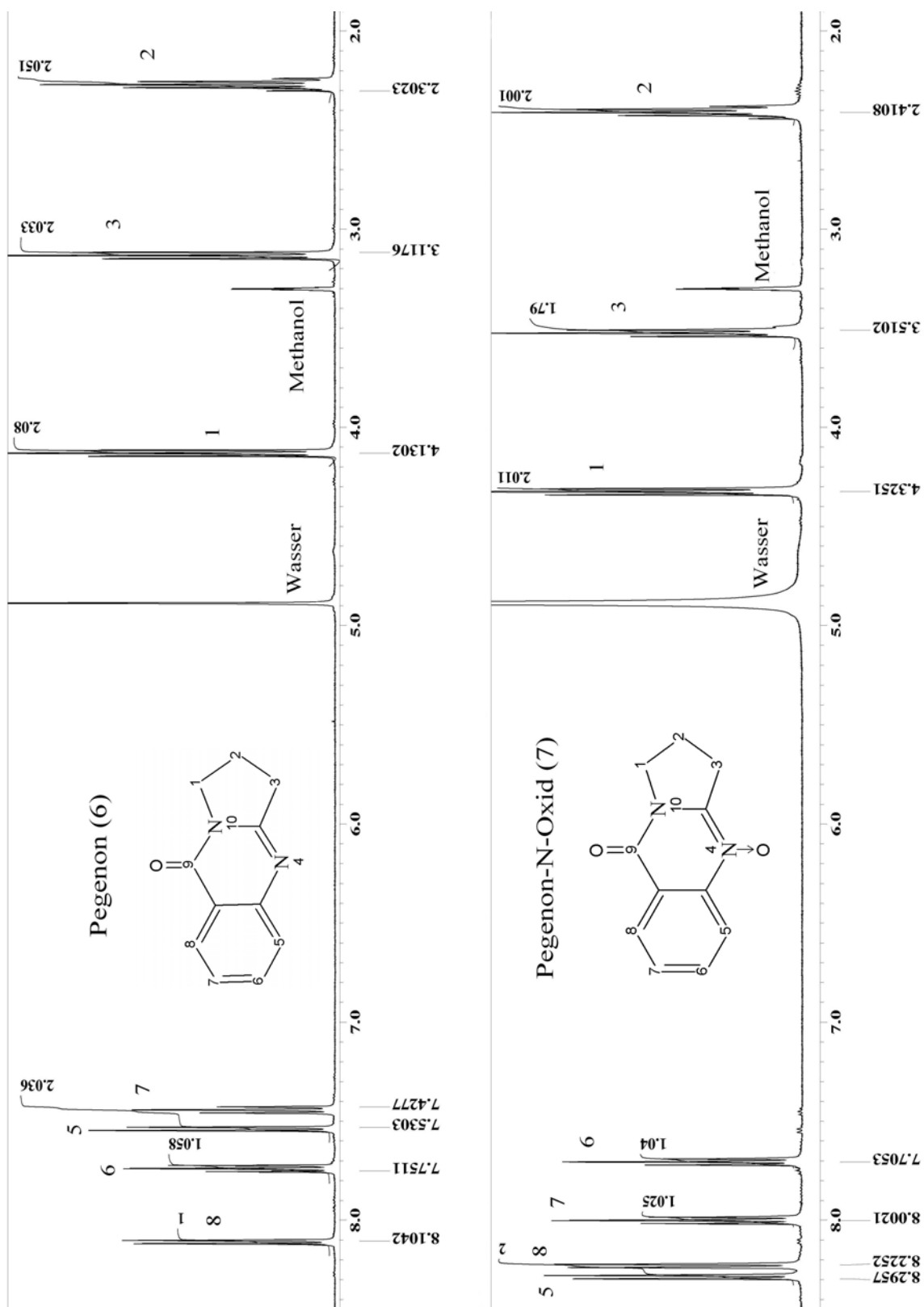


Abb. 10: ^1H -NMR Spektren der Verbindungen Pegenon (6) und Pegenon-N-Oxid (7) in Methanol- d_4 , 500 MHz.

Das IR-Spektrum zeigt eine Bande für die NO-Streckschwingung bei einer Wellenzahl von 800 cm^{-1} [102] sowie eine weitere Bande bei 1217 cm^{-1} , die in diesem Bereich charakteristisch für eine NO-Gruppierung ist [103]. Damit ist das Vorliegen von Pegenon-N-Oxid (7) gesichert und die Strukturaufklärung der drei Hauptsubstanzen des Oxidationsansatzes abgeschlossen.

Ein N-Oxid von Desoxypeganin (3) konnte nicht hergestellt und isoliert werden. Die Oxidationsversuche im Sauren (Essigsäure als Lösungsmittel) haben gezeigt, dass leichter an C-9 eine Oxidation zum Pegenon (6) stattfindet als am Stickstoff in Position 4. Dieser Stickstoff liegt im Sauren protoniert vor und das freie Elektronenpaar steht damit nicht zur Sauerstoffaufnahme zur Verfügung.

Wie quantitative Auswertungen gezeigt haben, verläuft die Oxidation zum Pegenon (6) im Sauren sehr träge. Im Basischen hingegen ist, trotz geringer Löslichkeit, schon nach einem Tag quantitativ Pegenon (6) entstanden. Die Protonierung des Amidin-Systems durch Essigsäure führt demnach zu einer verminderten Oxidation des α -ständigen Kohlenstoffatoms (C-9).

7.4. Oxidationsversuche mit Mikrowellen als Energiequelle

Das in Kapitel 7.1., Theoretischer Teil, beschriebene Verfahren zur Oxidation von Desoxypeganin (3) und Pegenon (6) ist durch die geringe Reaktionsgeschwindigkeit sehr zeitaufwändig. Die Durchführung einer organischen Reaktion, unter anderem Oxidationen mit Wasserstoffperoxid, innerhalb von Minuten unter Zuhilfenahme von Mikrowellen ist seit Jahrzehnten bekannt [113-115]. Mikrowellen sind elektromagnetische Wellen, deren Wellenlänge im Zentimeterbereich (genauer zwischen 1mm und 30 cm) liegen. Die effektivste Frequenz für polare Lösungsmittel wie z.B. Wasser,

bei der das Molekül von einem Rotationsgrundzustand in einen höheren (angeregten) Rotationszustand durch Energieaufnahme übergeht, liegt bei ungefähr 2,45 GHz. Das entspricht einer Wellenlänge von 12,25 cm. Die Vorteile der Mikrowelle gegenüber anderen konventionellen Energiequellen liegen im direkten Aufheizen der Reaktanden und des Lösungsmittels. Die eingesetzte Energie wird mit Mikrowellen effizienter zum Heizen genutzt. Es wird eine höhere Temperaturhomogenität gewährleistet und die Reaktionsmischungen rascher aufgeheizt. Sämtliche Spekulationen über spezielle und nichtthermische Effekte durch Mikrowellen sind bis jetzt in der Literatur nicht bestätigt worden [113].

7.4.1. N-Oxidation im Sauren

Es wurde als Edukt Pegenon (6) in Essigsäure gelöst und Wasserstoffperoxid zugegeben. Dieser Versuch wurde in einer handelsüblichen Mikrowelle bei 850 Watt durchgeführt und alle fünf Minuten eine Probe für HPLC-Messungen entnommen. Die analytischen Bedingungen waren wie in Kapitel 7.2., Theoretischer Teil, schon ausgearbeitet und es konnte so eine quantitative Aussage über die entstehenden Hauptprodukte getroffen werden. Über die Retentionszeiten und die UV-Spektren konnten diese den isolierten Substanzen aus Kapitel 7.3., Theoretischer Teil, zugeordnet werden. Vorversuche haben gezeigt, dass der Ansatz in der Mikrowelle durch Eis gekühlt werden muss. Ansonsten kommt es zu einem zu schnellen Verdampfen des Lösungsmittels. Es entsteht vorwiegend die ringoffene Struktur 1-(2'-Nitrobenzoyl)pyrrolidin-2-on (8) und nicht das Pegenon-N-Oxid (7). In Abbildung 11 ist zeitabhängig die Entstehung der beiden eben genannten Hauptprodukte sowie die Abnahme des Eduktes Pegenon (6) durch Mikrowellen aufgezeigt. Dabei werden nur

diese drei Substanzen in die quantitative Auswertung mit einbezogen. Entstehende Nebenprodukte werden hier nicht betrachtet. Nach fünf Minuten in der Mikrowelle sind schon 25 % des Pegenon-N-Oxides (7) entstanden und nach 10 Minuten über 30 %. Die Entstehung der ringoffenen Struktur mit 2 % ist dabei vernachlässigbar klein. Die weitere Reaktion bis 30 Minuten in der Mikrowelle bringt kaum eine weitere Umsetzung zum Pegenon-N-Oxid (7). Die quantitative Menge an Nebenprodukten nimmt lediglich zu. Anhand dieser zeitsparende Methode lässt sich innerhalb von 10 Minuten das Pegenon-N-Oxid (7) in einer befriedigenden Ausbeute von 30 % herstellen und kann dann präparativ getrennt werden.

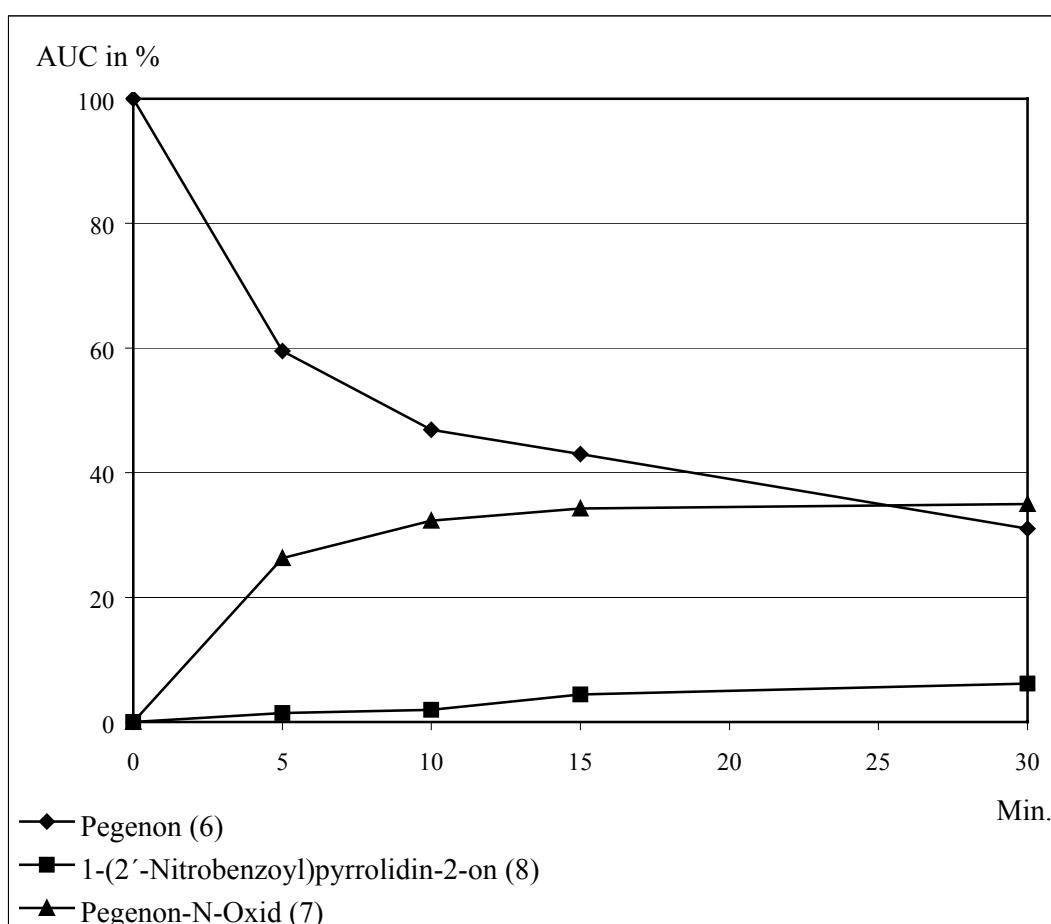


Abb. 11: Herstellung von Pegenon-N-Oxid (7) im Sauren mit Hilfe von H_2O_2 und Mikrowellen.

7.4.2. N-Oxidation im Basischen

Neben den Oxidationen im sauren Milieu wurde versucht, Desoxypeganin-N-Oxid im Basischen herzustellen. Dieser Versuch wurde direkt im NMR-Röhrchen durchgeführt, um den Reaktionsverlauf kernresonanzspektroskopisch zu verfolgen. Dazu wurde das Edukt Desoxypeganin (3) in deuteriertem Methanol gelöst und mit Kaliumhydroxid und einem Tropfen Wasserstoffperoxid versetzt. Die Probe wurde dann minutenweise der Mikrowellenstrahlung ausgesetzt und die Oxidation kernresonanzspektroskopisch verfolgt.

Nach zwölf Minuten bei 425 Watt Mikrowellenstrahlung wird Desoxypeganin (3) (Abb. 12, Ziffern mit Punkt) zu über 60 % zu Pegenon (6) (Abb. 12, Ziffern ohne Punkt) oxidiert. Dabei erweisen sich die Pegenon (6) Protonen an C-3 als acide. Sie werden gegen Deuterium ausgetauscht, so dass das Integral weniger als zehn Prozent des erwarteten Wertes zeigt. Da nun die Protonen an C-2 nur noch zwei Kopplungspartner haben, werden sie nur zu einem Triplett aufgespalten. Im Gegensatz dazu zeigt Desoxypeganin (3) unter denselben Bedingungen keine C-H-Acidität wie sich leicht an den Integralen der Protonen an C-3. im Vergleich zu denen an C-2. ablesen lässt.

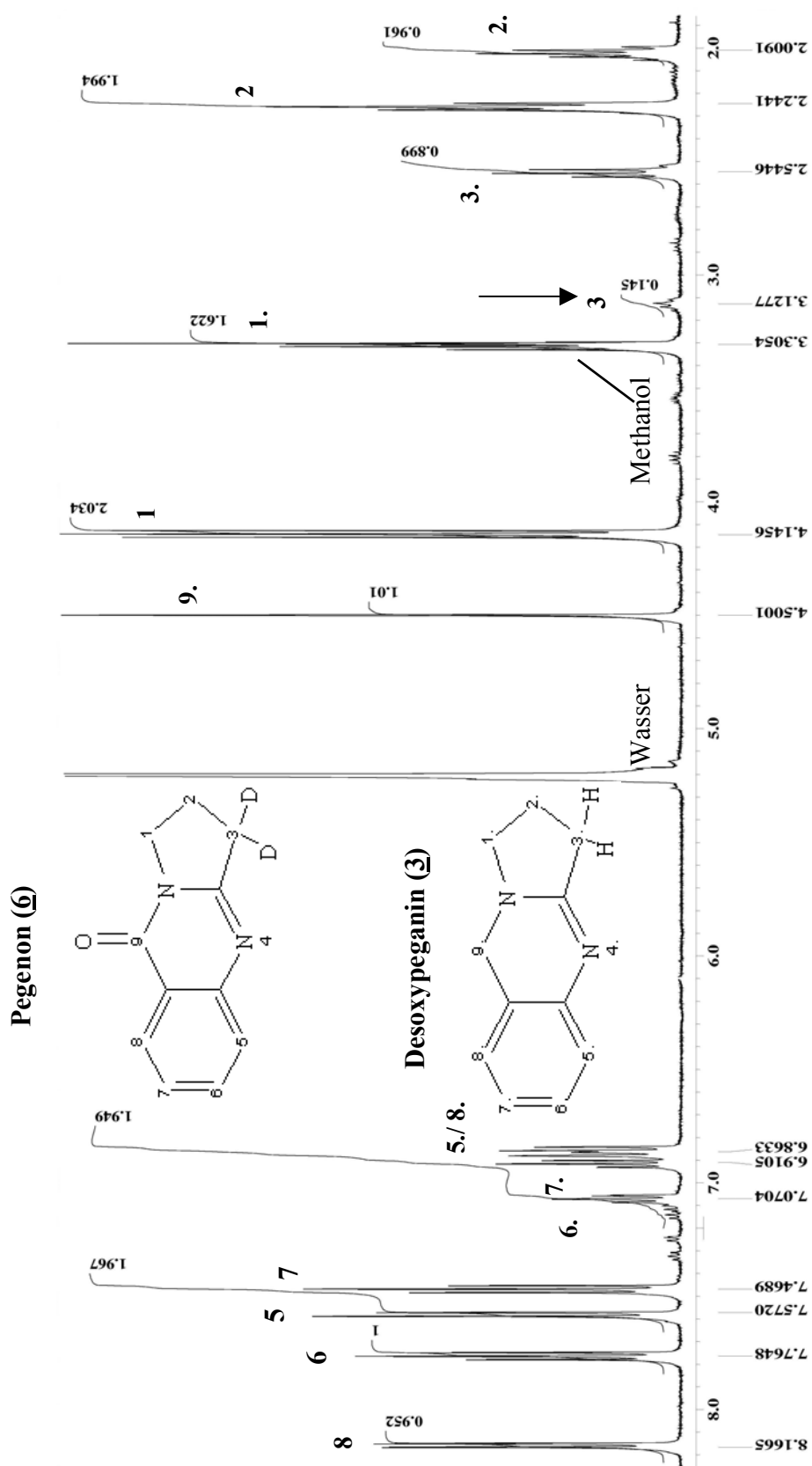


Abb. 12: H-D-Austausch bei Pegenon (6), ^1H -NMR-Spektrum in Methanol-d_4 , 500 MHz.

7.5. Desoxypeganin-N-Oxid und Pegenon-N-Oxid

Desoxypeganin (3) mit einem pK_a -Wert von 9,12 liegt im Neutralen bis schwach Basischen protoniert vor. Dadurch steht das freie Elektronenpaar an N-4 zur Oxidation und zur Anlagerung des Sauerstoffes nicht zur Verfügung. Die Bildung und damit die Herstellung von Desoxypeganin-N-Oxid wird verhindert und es wird an C-9 zum Pegenon (6) oxidiert. Pegenon (6) mit einem pK_a -Wert von 3,54 ist wesentlich schwächer basisch, das freie Elektronenpaar an N-4 steht zur Anlagerung von Sauerstoff zur Verfügung und es kann sich das Pegenon-N-Oxid (7) bilden.

8. Biotransformation von Desoxypeganin

Die Biotransformation ist ein unverzichtbarer Teilbereich bei der umfassenden Prüfung eines Xenobiotikums, da sie zur Erstellung eines therapeutischen sowie toxischen Profils eines neuen Arzneistoffes gehört. Die Biotransformation kann zur Entgiftung aber auch zur Giftung des Arzneistoffes führen. Inaktive Substanzen können durch Metabolisierung in aktive Arzneistoffe übergehen, toxische Metabolite oder reaktive Intermediate bilden. Der Einsatz von in-vitro Testsystemen wie Methoden an perfundierten Organen, Zell- und Gewebekulturen und subzellulären Testsystemen soll dabei schnell und einfach Informationen über den Metabolisierungsweg liefern. Mit diesen Vorversuchen versucht man die Anzahl an Tierversuchen aus ethischen und wirtschaftlichen Gründen zu minimieren. In der Vergangenheit wurden immer wieder Modelle vom isolierten rekombinanten Enzym bis hin zum perfundierten Organ entwickelt, um möglichst verlässliche Voraussagen vom in-vitro oder in-vivo Modell bis hin zu den klinischen Prüfungen am Menschen zu erhalten. Ein kompletter Ersatz

der Tierversuche gegen in-vitro Modelle ist in der näheren Zukunft allerdings noch als unrealistisch einzuschätzen. Abschliessend bleibt das in-vitro Modell immer ein Kompromiss zwischen der Einfachheit der Versuche und der vollständigen Übertragbarkeit auf den Menschen [116].

8.1. Die Leber als Enzymquelle

Die Leber ist besonders reich an Enzymen und eignet sich aufgrund der guten Durchblutung bestens als Ort für die Biotransformation. Ebenso sind die Nieren, die Haut, die Lungen, der Darm sowie Neuronen im Hirn an der Metabolisierung eines Xenobiotikums in unterschiedlichem Maße beteiligt [116,117]. Für die Charakterisierung der Biotransformation von Desoxypeganin (3) wurde als Enzymquelle die Kaninchenleber bzw. der 9000 g Überstand der aufgearbeiteten Leber gewählt. Als vorteilhaft erweist sich hierbei die unproblematische Bereitstellung der Enzymquelle sowie der relativ einfache analytische und zeitliche Aufwand. In-vivo Modelle sind neben der hohen Belastung von Mensch und Tier mit Xenobiotika durch Sammeln und Extraktion von Körperflüssigkeiten ausserdem mit einem wesentlich höheren Zeitfaktor verbunden. Daneben müssen physiologische Bestandteile z.B. aus dem Blut entfernt werden und es besteht oft die Notwendigkeit der radioaktiven Markierung aufgrund der sehr geringen Konzentration in Blut und Urin. Zusätzlich bergen in-vivo Untersuchungen die Gefahr, dass sich instabile, reaktive und damit oft toxische Metaboliten in Körperflüssigkeiten nicht mehr nachweisen lassen. Die Ursache hierfür sind entweder weitere enzymatische oder chemische Umwandlungen oder aber Reaktionen dieser Metabolite mit zelleigenen Bestandteilen. Oftmals sind solche toxische Produkte so beständig, dass sie nach Bildung in der Leber nicht nur dort,

sondern auch in anderen Organen Schaden anrichten ohne dass sie dabei im Urin gefunden werden. Im Harn und im Blut treten vornehmlich stabile, nicht reaktive, gut wasserlösliche Metaboliten mit sehr langer Lebensdauer auf [118]. Für Informationen über die Biotransformation in einem sehr frühen Entwicklungsstadium von Desoxypeganin (3) scheint daher dieses in-vitro Modell, nämlich das subzelluläre System einer Tierleber, für uns als am besten geeignet.

8.1.1. Aufarbeitung der Kaninchenleber (9000 g Überstand)

Den 9000 g Überstand gewinnt man durch differentielle Zentrifugation nach Zerkleinern und Homogenisieren einer Leber, die während der kompletten Aufarbeitung auf 0 - 4°C temperiert wird. In Abbildung 13 ist dies schematisch mit einem Becherglas und einem Pistill dargestellt. Dabei werden die Zellmembranen aufgebrochen und die Membranen des endoplasmatischen Retikulums zerrissen. Die Bruchstücke des endoplasmatischen Retikulums bilden Vesikel, die den Hauptteil der Mikrosomenfraktion ausmachen. Die Mikrosomenfraktion der Leber ist die wichtigste Quelle für Biotransformationsenzyme und enthält vor allem Enzyme aus der grossen Familie von Cytochrom P450. Diese Superfamilie ist an den meisten Biotransformationsvorgängen von Xenobiotika beteiligt und stellt damit die wichtigste Enzymfamilie bei der Betrachtung von Metabolisierungsreaktionen dar [119,120]. Durch Zentrifugation des Homogenates bei 600 g können Zellbruchstücke, Bindegewebsfasern und Zellkerne als Sediment abgetrennt werden. Bei 9000 g werden die Mitochondrien als Bodensatz separiert. Die Mitochondrien enthalten vorwiegend Enzyme der Atmungskette, der oxidativen Phosphorylierung und des Fettabbaus und spielen in der Biotransformation eine untergeordnete Rolle. Dieser gewonnene

Überstand wird als 9000 g Überstand bezeichnet. Die Mikrosomenfraktion kann man durch Zentrifugation bei 100 000 g vom Zytosol abtrennen (Abb. 13). Die für uns wichtige Enzymquelle ist der 9000 g Überstand (auch S9 Mix, S9 Fraktion) und beinhaltet die Enzyme des Cytosols und der Mikrosomen. Die Mikrosomen enthalten dabei wie oben schon erwähnt, vorwiegend die Enzyme aus der Superfamilie von Cytochrom P450 und die UDP-Glucuronyltransferase (Phase II-Enzym).

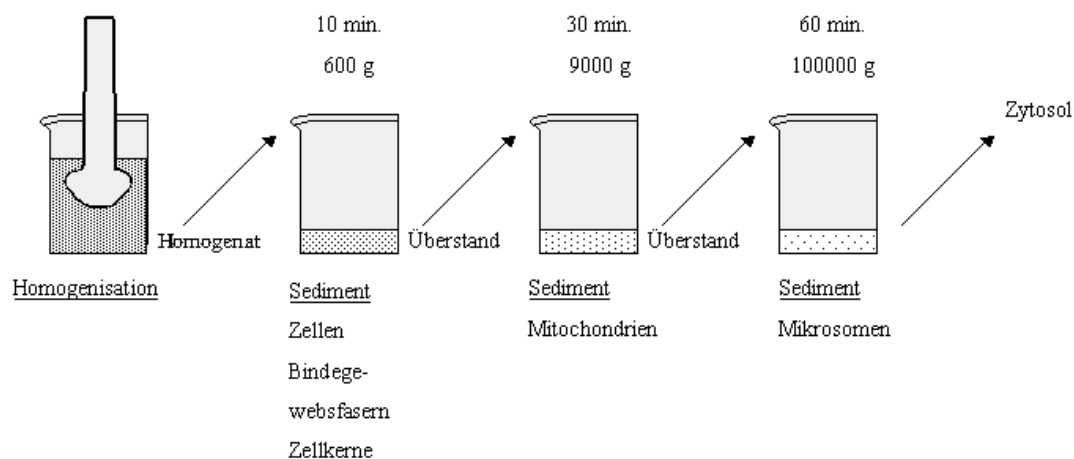


Abb. 13: Schematische Darstellung der differentiellen Zentrifugation eines Leberhomogenates.

Das Zytosol enthält die löslichen Enzyme der Biotransformation aus Phase II wie N-Acetyltransferase, Glutathion-S-Transferase und Sulfotransferase. Diese Enzyme benötigen für ihre Aktivität exogene Cofaktoren wie z.B. Acetyl-Coenzym A für die N-Acetyltransferase oder Glutathion für die Glutathion-S-Transferase. So wird ein umfassenderes Spektrum von Enzymen aus dem Metabolismus der Phase I und Phase II abgedeckt. Diese Enzyme beeinflussen sich während eines Metabolisierungsvorganges gegenseitig. Damit spiegelt der 9000 g Überstand eher die enzymatischen Verhältnisse

im späteren in-vivo Versuch am Menschen wieder als die Mikrosomen alleine. Allerdings weist der 9000 g Überstand eine geringere Enzymaktivität im Vergleich zu den beiden einzelnen Fraktionen Mikrosomen und Zytosol auf. Dadurch können möglicherweise Metaboliten unentdeckt bleiben, die unter die Detektionsgrenze fallen.

8.2. Cytochrom P450

Das Cytochrom P450-System umfasst eine Superfamilie, die in nahezu jeder lebenden Spezies auf der Erde vorkommt. Die aktuellsten Daten von Januar 2004 ergeben 1277 unterschiedliche Enzyme aus dieser Familie in Tieren, 1098 in Pflanzen, 207 in niederen Eukaryoten und 461 in Bakterien [121]. Das menschliche Genom codiert 58 Proteine dieser Familie, welche ausschliesslich im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind. Alle Vertreter dieser Superfamilie gingen aus Genverdopplungen und anschliessender Diversifizierung hervor. Die Substratspezifität, die sich während der Evolution entwickelt hat, ist in bestimmten Bereichen der Primärstruktur codiert. Dabei unterscheiden sich eng verwandte Vertreter nur in wenigen Aminosäuren, um eine unterschiedliche Substratspezifität auszubilden.

Das menschliche Cytochrom P450-System ist vorwiegend an der Metabolisierung von Xenobiotika beteiligt sowie an der Biosynthese von niedermolekularen Substanzen wie Steroiden, Prostaglandinen, Thromboxan und Derivaten von Fettsäuren. Im Weiteren sollen nur die relevanten Isoenzyme des Cytochrom P450-Systems erläutert werden, die im menschlichen Körper eine entscheidende Rolle bei der Biotransformation spielen.

8.2.1. Isoenzyme des Cytochrom P450-Systems

Die Cytochrom P450 Superfamilie hat innerhalb einer Familie eine Aminosäuresequenzhomologie von 40 %. Die Bezeichnung einer Familie erfolgt in arabischen Ziffern nach der Abkürzung „CYP“ (z.B. CYP 3). Ist die Homologie grösser als 55 %, so wird diese Familie in Unterfamilien eingeteilt und mit Grossbuchstaben bezeichnet (CYP 3A). Für eine weitere Unterteilung in Isoenzyme müssen sich die Aminosäuresequenzen zweier Unterfamilien um mindestens 3 % unterscheiden. Diese werden wieder mit arabischen Zahlen gekennzeichnet (z.B. CYP 3A4).

Eine sehr grosse Rolle in der Biotransformation von Xenobiotika spielen die Isoenzyme Cytochrom P450 3A4 und Cytochrom P450 2D6. Das CYP 3A4 ist am Metabolismus von über 50 % der heute angewendeten Arzneistoffe beteiligt. Dieses Isoenzym wird vorwiegend in der Leber und im Dünndarm gebildet und stellt das meistgebildete Isoenzym des Cytochrom P450-Systems dar [122]. In menschlichen Lebermikrosomen liegt der Gehalt dieses Isoenzym bei 30 % bezogen auf das gesamte CYP 450 System. Geringere Mengen werden in Nieren, Lungen und Gehirn exprimiert [120]. Erhöhung der Enzymkonzentration durch Induktion mit Barbituraten, Glucokortikoiden oder Rifampicin, spielen eine entscheidende Rolle in Fragen der Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffes und bei Wechselwirkungen mehrerer Wirkstoffe untereinander. Eine Inhibition von CYP 3A4 ist beispielsweise durch Flavonoide aus Grapefruitsaft möglich.

Das CYP 2D6 metabolisiert über 30 % der heute angewendeten Wirkstoffe und wird damit als das zweitwichtigste Enzym des Cytochrom P450-Systems angesehen. Dabei sind Antidepressiva und β -Blocker als typische Substrate zu nennen. Die Leber und das Gehirn stellen die Hauptbildungsorte für dieses Isoenzym dar. Der Gehalt liegt dabei in

menschlichen Lebermikrosomen bei 2 – 4 % [120,123,124]. Eine Induktion von CYP 2D6 ist bisher nicht bekannt. Ein Problem stellt hier die grosse individuelle Variabilität dar. Diese kommt durch den ausgeprägt genetischen Polymorphismus zustande und beeinflusst die Exprimierung. Das CYP 2D6 ist bei ungefähr 1 % der asiatischen Bevölkerung und bei 10 % der kaukasischen Bevölkerung nicht vorhanden [125,126]. Durch den Polymorphismus ergeben sich Konsequenzen für die weitere Entwicklung eines neuen Arzneistoffes sowie in der späteren praktischen Anwendung. Mit Hilfe einer CYP 2D6 Phänotypisierung kann man heutzutage die Patienten, je nach Metabolisierungsstatus in schwache Metabolisierer (Fehlen von CYP 2D6), extensive Metabolisierer (intaktes CYP 2D6) bis hin zu sehr schnellen Metabolisierern (höhere Enzymkonzentration von CYP 2D6 durch Genverdopplung) einteilen. Die Feststellung des Metabolisierer-Status ist z.B. in psychiatrischen Kliniken vor Einsatz von Psychopharmaka (vorwiegend Antidepressiva) ein Standardtest. Dies wird im Allgemeinen durch Einnahme einer Dextrometorphan-Lösung und anschliessender Blutabnahme bestimmt. Dabei wird das Verhältnis von dem Wirkstoff zu seinem Hauptmetaboliten Dextrophan (O-Demethylierungsprodukt von Dextrometorphan) per HPLC mit Fluoreszenzdetektion ermittelt. Der Patient wird eingestuft und die Dosierung des Medikaments kann jetzt individuell durch weitere Bluttests angepasst werden [123,127].

8.3. Inkubation mit dem 9000 g Überstand

Das allgemeine Vorgehen bei der Inkubation ist in Abbildung 14 wiedergegeben. Dabei werden als Substrate Lösungen von Desoxypeganin (3) und Pegenon (6) eingesetzt. Die Inkubationen wurden mehrfach bei zwei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Dabei

sollten mögliche qualitative oder quantitative Unterschiede, je nach Substrat und pH-Wert, beobachtet werden.

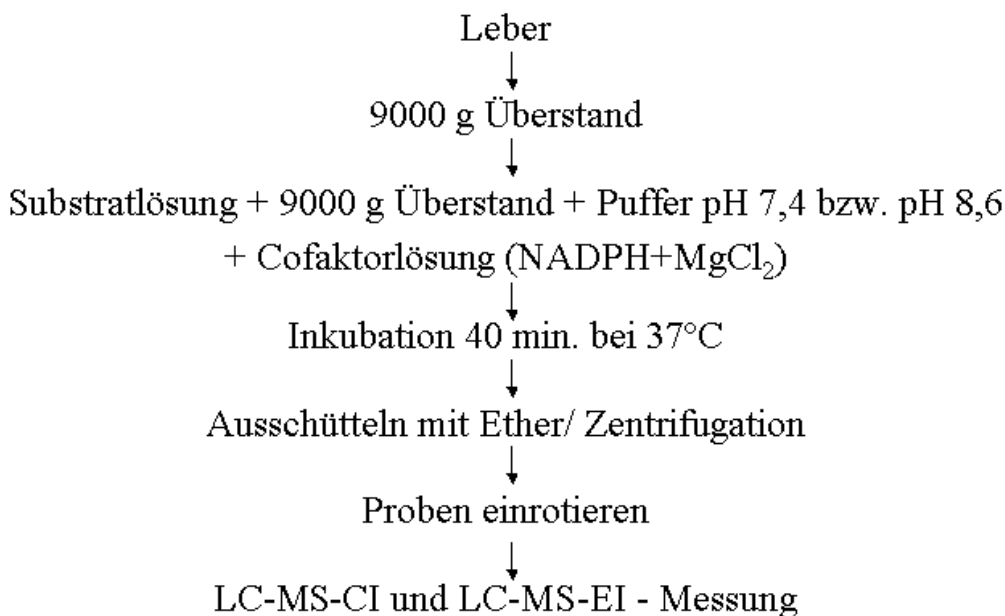


Abb. 14: In-vitro Metabolisierung, Trennung und Identifizierung der Metaboliten.

Die Substratlösung, der 9000 g Überstand, die Pufferlösung und die Cofaktorlösung wurden zusammen bei 37°C inkubiert. Ebenso wurden Proben inkubiert, bei denen jeweils ein Bestandteil, also Substratlösung, 9000 g Überstand oder Cofaktorlösung fehlte. Damit sollten mögliche beeinflussende Effekte und Abhängigkeiten dieser Komponenten untereinander analysiert werden. Diese Proben werden im Weiteren als Blindproben bezeichnet. Zur Aufarbeitung und Abtrennung der lipophilen Substanzen wurden diese Proben jeweils zweimal mit Ether ausgeschüttelt [128,129]. Nach Einengen am Rotavapor konnte man die einzelnen Proben nach Entwicklung einer geeigneten analytischen Methode per HPLC trennen (Methode **A2**) und durch Kopplung mit einem Massenspektrometer die Molekularmassen bestimmen.

8.4. Identifizierung der Hauptmetaboliten

Durch diese elegante Methode können die entstandenen Metabolite voneinander getrennt und dabei mit den Referenzsubstanzen aus Kapitel 7., Theoretischer Teil, bezüglich ihrer Retentionszeit, ihres UV-Spektrums und der Molekularmasse verglichen werden. Alle Proben wurden jeweils massenspektrometrisch mit chemischer Ionisation und Elektronenstossionisation vermessen. Um mögliche labile Metaboliten analysieren zu können, wurde die sanftere Methode der chemischen Ionisation (hier: CI^+ -MS) eingesetzt. Die Elektronenstossionisation (EI-MS) wurde angewendet, um die Fragmentierungsmuster mit denen der Literatur zu vergleichen.

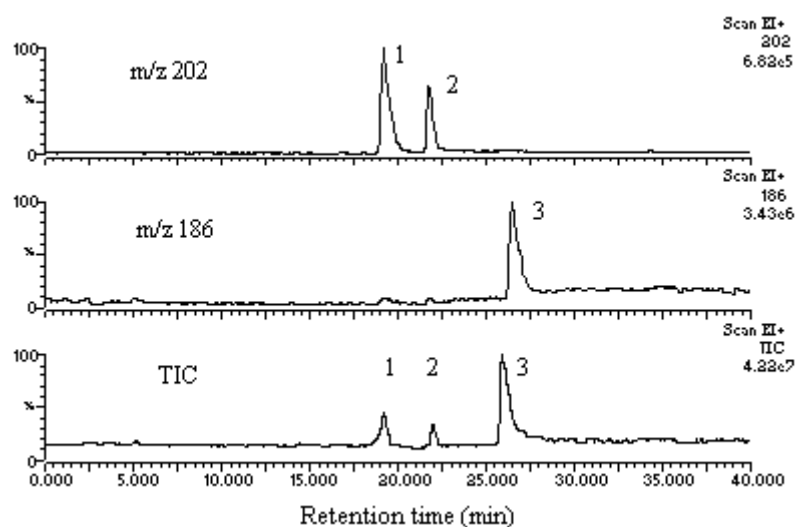


Abb. 15: Total-Ionenstrom-Chromatogramm (TIC) sowie SIM-Chromatogramme bei m/z 202 und m/z 186 aus einer Inkubationslösung mit Desoxypeganin (3). Peak 1 Vasicinon (2), Peak 2 Isovasicinon (2), Peak 3 Pegenon (6).

Sowohl die bei unterschiedlichen pH-Werten inkubierten Proben als auch die Vergleichsproben mit Desoxypeganin (3) und Pegenon (6) ergaben ein qualitativ einheitliches Bild der CI- und EI-Massenspektren. Letztendlich konnten drei Substanzen detektiert werden, die bei der in-vitro Biotransformation von Desoxypeganin (3) entstehen (Abb. 15).

Der Hauptmetabolit mit m/z 186 konnte schon aufgrund seines UV-Spektrums und der Retentionszeit dem Pegenon (6) zugeordnet werden. Die beiden anderen Metaboliten zeigen ein m/z 202.

Das Pegenon-N-Oxid (7) mit m/z 202 konnte anhand der Retentionszeit und des UV-Spektrums ausgeschlossen werden. In der Literatur werden verschiedene in-vivo Versuche mit Ratten beschrieben. Dabei stellt Pegenon (6) den Hauptmetaboliten von Desoxypeganin (3) dar, was unsere Messungen bestätigen. Daneben sind u.a. Hydroxylierungen am alicyclischen Ring beobachtet worden [22,130,131]. Aufgrund der Fragmentierungsmuster aus den EI-MS Messungen konnten die zwei Metaboliten mit m/z 202 den Substanzen Vasicinon (2) und Isovasicinon (9) zugeordnet werden (Abb.16 und 17). Vasicinon (9) besitzt in seinem Fragmentierungsmuster neben dem Basispeak ein Hauptfragment mit m/z 146, Isovasicinon (9) hingegen ein Hauptfragment mit m/z 173.

Die qualitativen Aussagen über den Metabolisierungsweg von Desoxypeganin (3) sind in Abbildung 17 zusammengefasst. Theoretisch erwartete N-Oxide von Desoxypeganin (3) oder Pegenon (6) konnten nicht nachgewiesen werden [90,91].

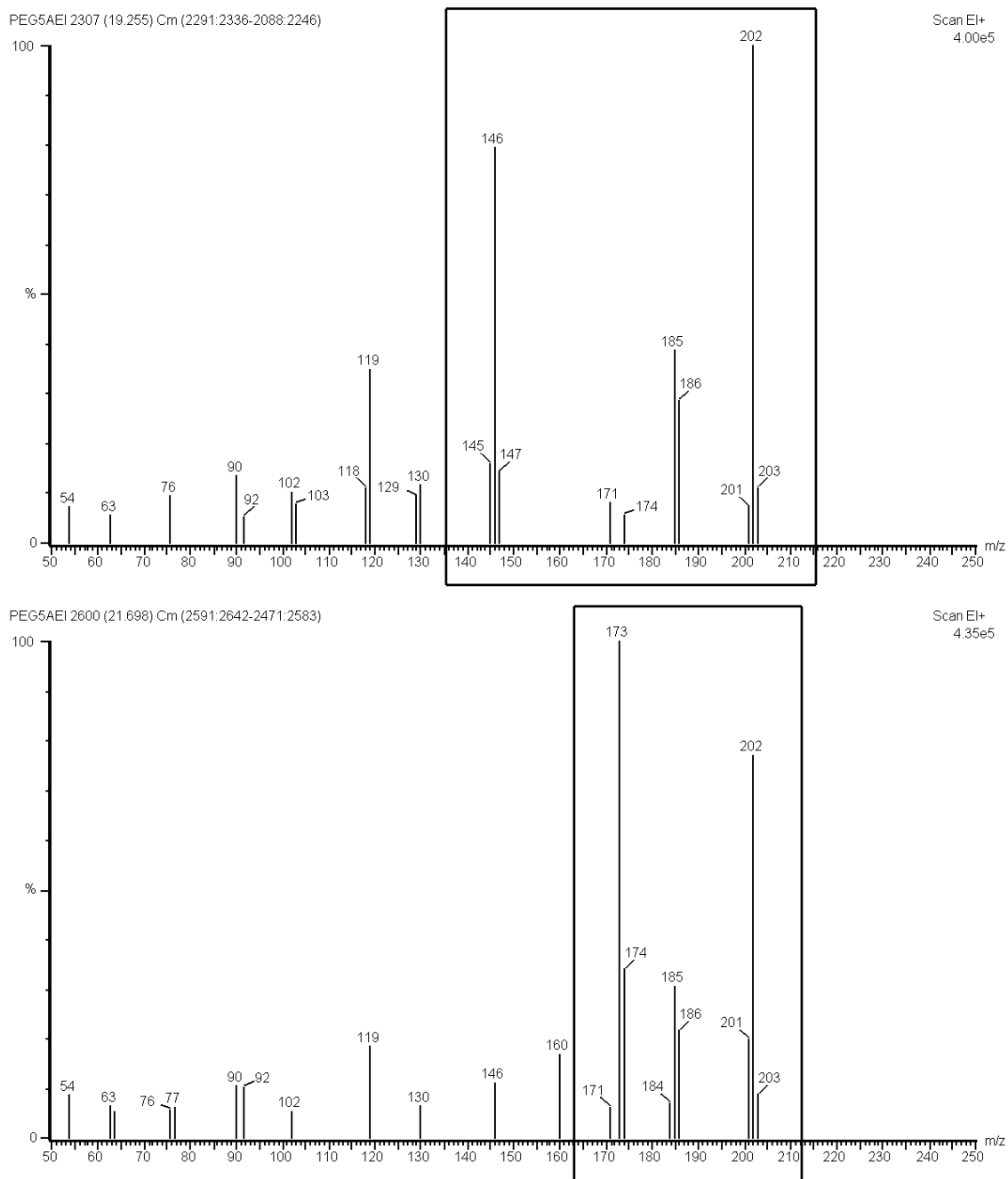


Abb. 16: Fragmentierungsmuster aus EI-MS Messungen nach Trennung per HPLC Methode A2 einer Inkubationslösung von Desoxypeganin (3). Vasicinon (2) oben, Isovasicinon (9) unten.

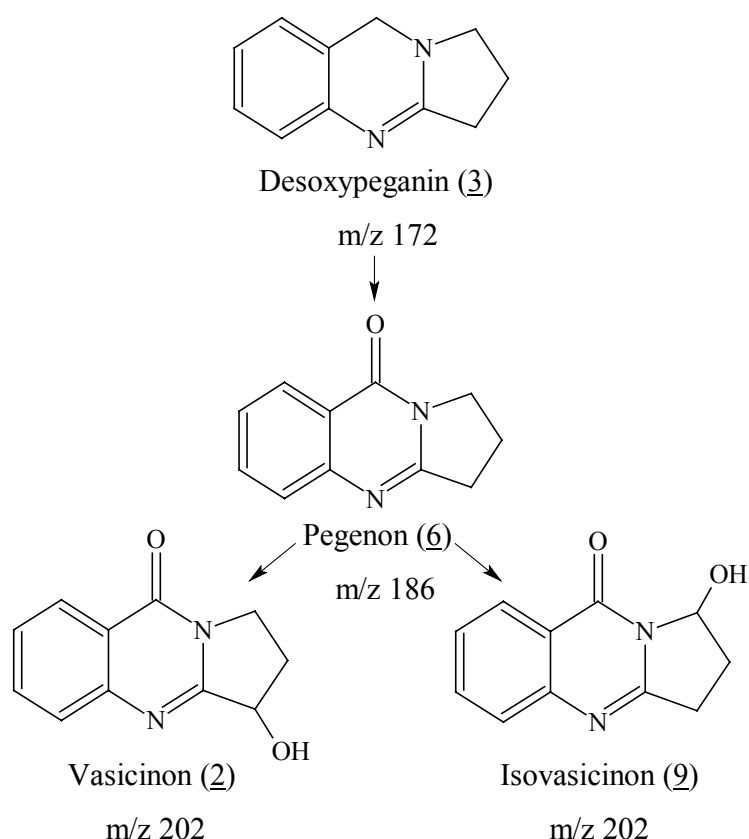


Abb. 17: Biotransformation von Desoxypeganin (3) durch aerobe Inkubation mit 9000 g Überstand einer Kaninchenleber.

8.5. Quantifizierung der Hauptmetaboliten

Um eine quantitative Aussage über die drei Hauptmetabolite zu erhalten, musste nach Anfertigung einer Eichgeraden mit Pegenon (6) die Wiederfindungsrate bestimmt werden. Dafür wurde als Substratlösung Pegenon (6) in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Die restlichen Komponenten wurden zupipettiert, wie in Kapitel 8.3., Theoretischer Teil, beschrieben und bei 0°C inkubiert. Durch diese niedrige Temperatur wird eine weitere Metabolisierung unterdrückt. Die Inkubationsansätze wurden wie in Kapitel 8.3., Theoretischer Teil, aufgearbeitet und quantitativ per HPLC und UV-Detektion ausgewertet. Die Steigungen der Eichgeraden

wurden mit und ohne Inkubation berechnet. Aus dem Quotient der Steigungen ergibt sich die Wiederfindungsrate, die bei 81,4 % lag. Mit dieser Methode ist es möglich, unbekannte Konzentrationen aus Inkubationsansätzen quantitativ zu bestimmen. Aus der Differenz zwischen berechneter Menge an Pegenon (6) und der eingesetzten Menge an Desoxypeganin (3) ist es möglich, auch die ungefähre Menge der beiden anderen Metabolite zu bestimmen. So gelang es, das Ausmaß der C-Oxidation und der Hydroxylierung am alicyclischen Ring abzuschätzen. In diese Betrachtung werden ebenso die Blindproben mit einbezogen. Die folgende Auflistung soll übersichtlich die Entstehung der Hauptmetabolite bei unterschiedlichen Ansätzen darstellen. Die Aufarbeitung bei verschiedenen pH-Werten zeigte keine quantitativen Unterschiede und wird somit nicht extra aufgeführt. Die folgenden Werte in Prozent beziehen sich auf eine Inkubationsdauer von 40 Minuten bei 37°C:

1. Desoxypeganin (3) als Substrat mit 9000 g Überstand und Coenzym NADPH
 - 78 % Pegenon (6), 10 % Summe aus Vasicinon (2) und Isovasicinon (9)
2. Desoxypeganin (3) als Substrat mit 9000 g Überstand ohne Coenzym NADPH
 - 42 % Pegenon (6), keine hydroxylierte Verbindung
3. Desoxypeganin (3) als Substrat ohne 9000 g Überstand mit Coenzym NADPH
 - 19 % Pegenon (6), keine hydroxylierte Verbindung
4. Pegenon (6) als Substrat mit 9000 g Überstand und Coenzym NADPH
 - 15 % Summe aus Vasicinon (2) und Isovasicinon (9)
5. Pegenon (6) als Substrat mit 9000 g Überstand ohne Coenzym NADPH
 - 5 % Summe aus Vasicinon (2) und Isovasicinon (9)
6. Pegenon (6) als Substrat ohne 9000 g Überstand mit Coenzym NADPH
 - keine hydroxylierte Verbindung

Desoxypeganin (3) zeigt eine quantitative Oxidation zum Pegenon (6) unter den in Kapitel 8.3., Theoretischer Teil, beschriebenen Bedingungen. Sogar ohne Enzymquelle reicht der Luftsauerstoff aus, um Pegenon (6) in beachtlicher Menge von 19 % zu bilden. Der 9000 g Überstand enthält von Natur aus eine gewisse NADPH-Menge und zeigt damit bei der Blindprobe ohne zusätzliches Coenzym eine C-Oxidation von 42 %. Bei den Blindproben fällt besonders auf, dass das Ausmaß der Bildung der hydroxylierten Metaboliten sehr gering bis nicht vorhanden ist. Man benötigt also optimale Bedingungen mit 9000 g Überstand und Coenzym, um während der in-vitro Biotransformation den alicyclischen Ring hydroxylieren zu können.

8.6. Enzymkinetische Betrachtung

Weitere Informationen für die Charakterisierung der Biotransformation liefern die enzymkinetischen Daten, die beschreiben, wie schnell Desoxypeganin (3) mit dem 9000 g Überstand umgesetzt wird. Hierzu muss man den Proteingehalt sowie den Cytochrom P450-Gehalt dieses Überstandes kennen.

8.6.1. Proteinbestimmung nach Biuret

Die Biuret-Reaktion ist spezifisch für alle Substanzen mit zwei oder mehr Peptidbindungen. Dabei lagern sich Kupferionen in alkalischer Lösung an die Peptidbindungen und bilden einen Kupfer-Protein-Chelatkomplex. Dieser entstehende rot- bis blaviolette Farbkomplex kann photometrisch bei 546 nm erfasst werden. Die Intensität ist bei einer definierten Reaktionszeit der Zahl der Peptidbindungen und damit der Proteinkonzentration proportional [132,133].

Es wird eine Eichgerade mit unterschiedlichen Konzentrationen eines Proteinstandards aus Rinderserumalbumin (Bovine-Serum-Albumin) angefertigt. Nach Zugabe des Biuret-Reagenzes wird genau nach einer bestimmten Zeit (hier 30 Minuten) die UV-Absorption gemessen. Der 9000 g Überstand wird 1:17 mit Wasser verdünnt und die Proteine mit 20 %-iger Trichloressigsäure ausgefällt, um gelöste störende Substanzen aus dem Zytosol zu entfernen. Nach Zentrifugation wird das Sediment wieder aufgelöst und nach gleicher Vorgehensweise wie die Proben der Eichgeraden aufbereitet. Der Proteingehalt des 9000 g Überstandes kann jetzt einfach über die Absorption aus der Eichgeraden abgelesen werden. Der 9000 g Überstand (1 Teil Leber mit 2 Teilen Phosphatpuffer; Kapitel 8.1.1., Theoretischer Teil) enthält nach der Auswertung 56,78 mg Protein/ ml 9000 g Überstand.

8.6.2. Gehaltsbestimmung von Cytochrom P450

Cytochrom P450 bildet mit Kohlenmonoxid einen Komplex, welcher bei 450 nm ein charakteristisches Absorptionsmaximum aufweist [134,135]. Es wird also die Absorption des 9000 g Überstandes gemessen und nach Einleiten von Kohlenmonoxid das Differenzspektrum aufgenommen. Aus dieser Absorptionsdifferenz lässt sich dann über das Lambert-Beersche-Gesetz der Gehalt an Cytochrom P450 im Protein berechnen [136,137]. Sauerstoff und Kohlenmonoxid binden kompetitiv an derselben Stelle des Enzyms. Dadurch wird zu den Proben Natriumdithionit als Reduktionsmittel gegeben, um quantitativ den Cytochrom P450-CO-Komplex bestimmen zu können. Im UV-Gerät wird zuerst ein Nullabgleich mit einer Verdünnung aus 9000 g Überstand und Natriumdithionit durchgeführt. Dann wird Kohlenmonoxid in die Probe eingeleitet. Der Komplex ist nicht stabil, so dass man zeitabhängige Messungen durchführen muss, um

das Absorptionsmaximum zu ermitteln (Abb. 18). Über die Absorptionzunahme und den Extinktionskoeffizienten des Enzyms ergibt sich ein Gehalt von 1,28 nmol CYP 450/ mg Protein.

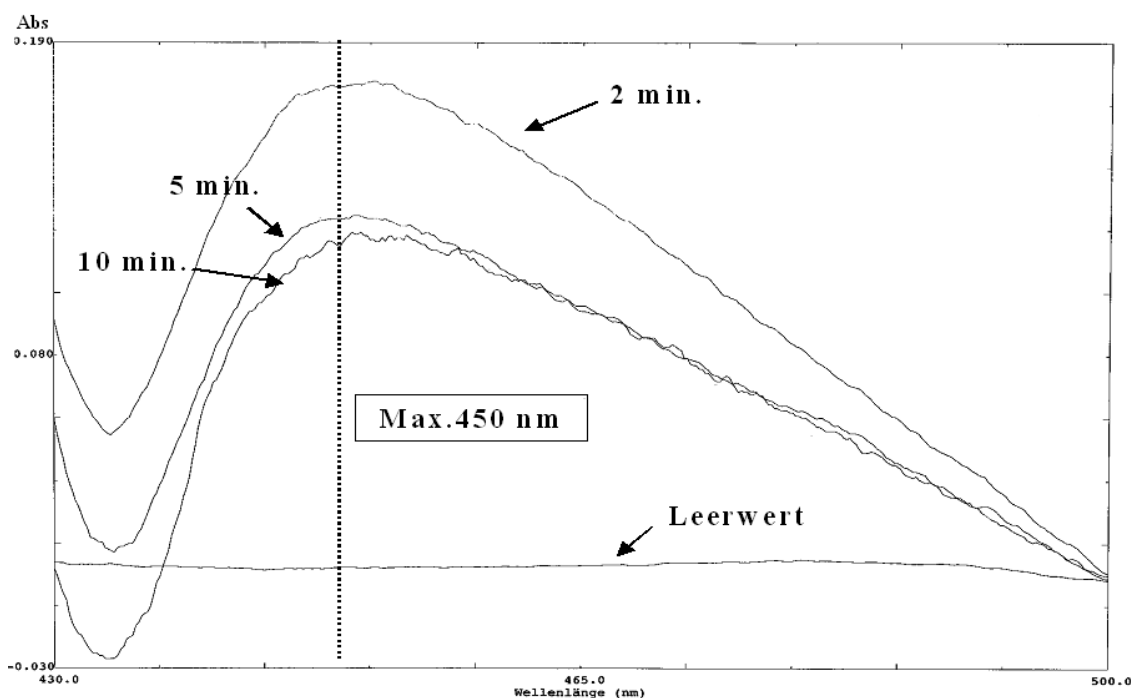


Abb. 18: Zeitabhängige CO-Differenzspektren des 9000 g Überstandes nach Einleiten von Kohlenmonoxid.

8.6.3. Michaelis-Menten Kinetik und Lineweaver-Burk Linearisierung

Mit besonderem Interesse wurde die Frage verfolgt, wie hoch die Affinität des Substrates Desoxypeganin (3) zu seinem metabolisierendem Enzym, dem Cytochrom P450 sei. Je höher die Affinität des Substrates zum Enzym, desto kleiner ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein anderes Substrat gebunden und damit umgesetzt wird. Die Michaelis Konstante K_M gibt die Substratkonzentration an, bei der die Hälfte der

aktiven Zentren des Enzyms besetzt sind. Experimentell wurden zunächst in verschiedenen Ansätzen jeweils gleiche Mengen der Enzympräparation mit steigenden Mengen des Substrates bei 37°C inkubiert und dabei die Reaktionsgeschwindigkeit v gemessen. Dies kann man über die UV-photometrisch gemessenen Absorptionsänderungen berechnen. Es ist wichtig, die Anfangsgeschwindigkeit zu bestimmen oder auf diese zu extrapolieren, da im Verlauf der Inkubation die Substratkonzentration immer weiter abnimmt. Die Absorptionsänderungen werden geringer und die Messungen damit ungenauer. Ausserdem wird der Einfluss der Rückreaktion immer grösser. Grundsätzlich bestehen bei der UV-photometrischen Messung die Möglichkeiten, entweder die Zunahme des Produktes, die Abnahme des Substrates oder gar die Abnahme des Coenzym NADPH zu messen. Bei der reduzierten Form des Coenzym NADPH ist die aromatische Natur des Pyridinringes aufgehoben und besitzt ein UV-Maximum bei 340 nm. Der Verbrauch des Coenzym und die damit verbundene Abnahme der Absorption ist ein direktes Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit. Dabei musste zuerst ein Blindwert ohne Substrat gemessen werden, der dann später von der Messung mit Substrat subtrahiert wurde. Der 9000 g Überstand enthält Substanzen, die ebenfalls enzymatisch umgesetzt werden und damit das Ergebnis positiv verfälschen würde.

Die berechneten Reaktionsgeschwindigkeiten aus dem Inkubationszeitraum von 5 - 15 Minuten wurden gegen die verschiedenen Substratkonzentrationen aufgetragen. Die Bestimmung der Michaelis-Konstante K_M erfolgte aber genauer durch die Lineweaver-Burk Linearisierung. Dabei bedient man sich eines mathematischen Tricks und trägt die reziproken Werte der gemessenen Reaktionsgeschwindigkeit gegen die reziproken

Werte der Substratkonzentration auf. Man erhält eine Gerade und kann K_M und V_{\max} als Reziproke des Abzissen- bzw. Ordinatenabschnittes direkt ablesen (Abb. 19).

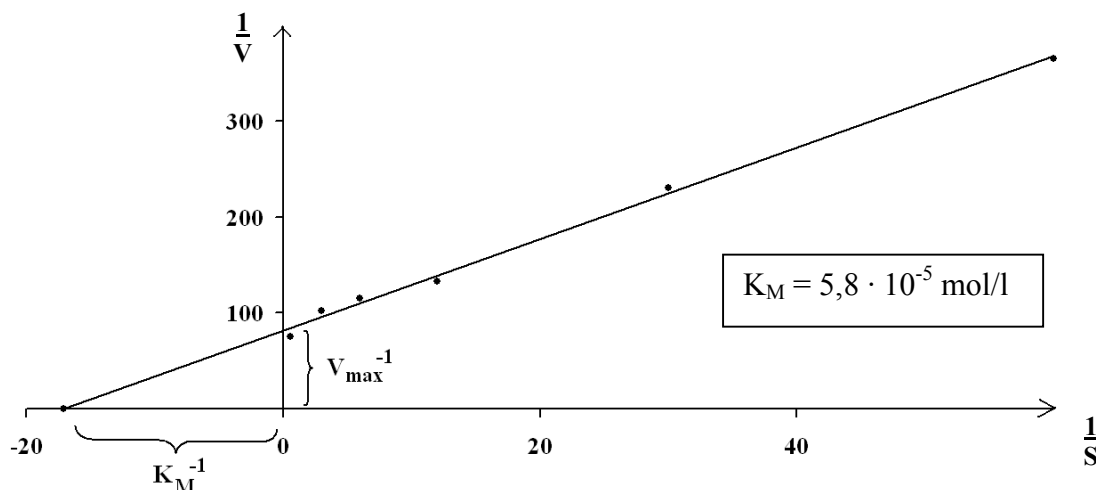


Abb. 19: Lineweaver-Burk Linearisierung mit Bestimmung der Michaelis-Konstante.

Die berechnete Michaelis-Konstante K_M (charakteristische Konstante für jedes Enzym) von $5,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ zeigt, dass Desoxypeganin (3) zu einer Gruppe von Substraten gehört, welche eine hohe Affinität zum Cytochrom P450-System zeigen [138,139]. Es genügt also eine relativ niedrige Substratkonzentration, um eine Halbsättigung am Enzym zu erzielen. Über die berechneten Protein- und CYP 450-Konzentrationen aus Kapitel 8.6.1. und 8.6.2., Theoretischer Teil und den graphisch bestimmten V_{\max} -Wert lassen sich folgende Aussagen treffen:

- 4,32 nmol Desoxypeganin (3) werden bei 37°C und einem pH-Wert von 7,4 pro Minute von 1 mg Protein umgesetzt.
- 3,37 nmol Desoxypeganin (3) werden bei 37°C und einem pH-Wert von 7,4 pro Minute von 1 nmol CYP 450 umgesetzt.

8.7. Inkubationsversuche mit menschlicher Leber (S9 Mix)

In Kapitel 8.2.1., Theoretischer Teil, wurden schon die Isoenzyme des CYP 450 beschrieben. Welches Isoenzym bei der Metabolisierung von Desoxypeganin (3) im menschlichen Körper die entscheidende Rolle spielt, ist eine sehr wichtige Frage und konnte über diesen Versuch abgeklärt werden. Dabei setzte man jeweils zum Inkubationsansatz mit S9 Mix der menschlichen Leber Substrate sowie Inhibitoren der beiden wichtigsten Isoenzyme für die Biotransformation (CYP 2D6 und CYP 3A4) ein. Ebenso wurde interessehalber auf das Isoenzym CYP 1A2 getestet, welches einen relativen Gehalt von 12 % bezogen auf CYP 450 im S9 Mix der menschlichen Leber aufweist und ungefähr 4 % aller Arzneistoffe metabolisiert [120,124]. Die Substrate und Inhibitoren wurden in gleicher molarer Menge wie Desoxypeganin (3) eingesetzt und per HPLC (Methode **A2**) quantitativ Desoxypeganin (3) gegenüber dem Hauptmetaboliten Pegenon (6) ausgewertet. Dabei wurde der Extinktionskoeffizient mit in die Berechnung einbezogen. Eine Inkubation nur mit Desoxypeganin (3) wurde zu Vergleichszwecken ebenso durchgeführt (Abb. 20). Die Substrate sowie die Inhibitoren der Isoenzyme von CYP 450 sind der Literatur entnommen [120,123,124]. Ansatz Nr. 1, in welchem nur Desoxypeganin (3) eingesetzt wurde, zeigte ungefähr eine 50 %-ige Metabolisierung zu Pegenon (6). Die Ansätze 2, 3, 6 und 7 bestätigen diesen Wert. Ansatz 4 bei dem ein 2D6-Substrat eingesetzt wurde, zeigt eine 20 %-ig geringere Metabolisierung zum Pegenon (6), da das Isoenzym zusätzlich zum Desoxypeganin (3) noch Metoprolol metabolisiert. Die Inhibition von 2D6 mit Hilfe von Chinidin lässt sogar die Bildung von nur 19 % Pegenon (6) zu.

Ansatz Nr.	Wirkstoff	Inhibitor/Substrat	Desoxypeganin (<u>3</u>)	Pegenon (<u>6</u>)
1	Inkubation ohne weiteren Wirkstoff		55 %	45 %
2	Theophyllin	1A2-Substrat	48 %	52 %
3	α - Naphthoflavon	1A2-Inhibitor	47 %	53 %
4	Metoprolol	2D6-Substrat	75 %	25 %
5	Chinidin	2D6-Inhibitor	81 %	19 %
6	Nimodipin	3A4-Substrat	53 %	47 %
7	Ketoconazol	3A4-Inhibitor	48 %	52 %

Abb. 20: Isoenzymversuche mit menschlicher Leber (S9 Mix). Die Prozentangaben beziehen sich auf die integrale Auswertung der HPLC-Chromatogramme.

Mit diesen Versuchsergebnissen konnte relativ einfach das Isoenzym 2D6 bestimmt werden, welches Desoxypeganin (3) zu seinem Hauptmetaboliten Pegenon (6) metabolisiert. Das bedeutet für die weitere Entwicklung von Desoxypeganin (3) zum Arzneistoff und für den späteren Einsatz am Patienten zur korrekten Dosisermittlung, dass zuerst der Metabolisierer-Status festgestellt werden muss, ähnlich wie es bei den Antidepressiva der Fall ist.

9. Pharmazeutische Salze von Desoxypeganin

Die Auswahl und Herstellung eines adäquaten Salzes eines neuen Wirkstoffes nimmt einen sehr grossen Stellenwert in der Entwicklung ein. Mittlerweile werden mehr als die Hälfte aller Wirkstoffe in der medizinischen Anwendung als Salze verabreicht [140]. Die Salzbildung kann die Eigenschaften eines Wirkstoffes teilweise sehr stark verändern. Die Bioverfügbarkeit, der Schmelzpunkt, die Hygroskopizität, die chemische Stabilität, der pH-Wert des gelösten Wirkstoffes, die Kristallform und die mechanischen Eigenschaften werden in der Regel beeinflusst. Vor allem ist die Verbesserung der Wasserlöslichkeit sowie die chemische und physikalische Stabilität erwünscht [141]. Für sämtliche pharmakologische Tests und in-vitro Studien wie Rezeptorbindung, Enzyminhibition oder Versuche mit Zellkulturen ist eine ausreichende Wasserlöslichkeit die Grundvoraussetzung. Die meisten organischen Säuren oder Basen erfüllen diese Eigenschaft nicht, so dass die Salzbildung einen notwendigen Arbeitsschritt darstellt. Salze können sich in-vivo auch in ihrem pharmakokinetischen Verhalten unterscheiden, so dass man sich diese Eigenschaften für unterschiedliche Indikationen zunutze machen kann. Bei einem Analgetikum zum Beispiel ist eine schnelle Wirkung erwünscht, die nur durch eine hohe Löslichkeit, nachfolgender verstärkter Diffusion und damit einer hohen Bioverfügbarkeit erreicht werden kann. Der Wirkstoff wird dann schneller eliminiert und besitzt so eine kürzere Aktivität. Ist eine langandauernde Wirkung erwünscht, kann man ein schwer wasserlösliches Salz einsetzen, um einen gewissen Retardeffekt zu erzielen. Die richtige Auswahl eines Salzes stellt damit einen wichtigen Faktor in der frühen Entwicklungsphase dar und muss gut überlegt werden [142]. Bei einer Umentscheidung in einer späteren Phase der Entwicklung könnte man die Ergebnisse von sämtlichen Studien verwerfen. In allen

klinischen Phasen (I, II, III) muss das gleiche Salz nach dem gleichen Herstellungsverfahren nach GLP validiert verwendet werden. Auch das gleiche Salz nach einer anderen Herstellungsvorschrift bewirkt Neubeginn in Phase I. Das würde den straff gesetzten Zeitplan verlängern und damit enorme wirtschaftliche Kosten für die pharmazeutische Industrie bedeuten. Die folgenden Versuche sollen Salze von Desoxypeganin (3) mit verschiedenen anorganischen und organischen Säuren vergleichend charakterisieren. Dabei wurde auf eine möglichst einfache Herstellung, hohe Ausbeute, die Erfassung der Morphologie und des Schmelzpunktes und die direkte Verpressbarkeit der Salze zu Tabletten geachtet. Diese Versuche sollen eine Vorauswahl treffen, an denen man sich bei späteren Entscheidungen orientieren kann.

9.1. Herstellung von Desoxypeganin-Salzen

Salze der folgenden Säuren wurden vergleichsweise hergestellt: Salzsäure, Schwefelsäure, Bromwasserstoffsäure, ortho-Phosphorsäure, Maleinsäure, Zitronensäure, Methansulfonsäure und Weinsäure. Die Salze wurden immer nach der gleichen Vorschrift hergestellt, um die zu betrachtenden Faktoren miteinander vergleichen zu können. Desoxypeganin (3) wurde in Ethanol gelöst, filtriert und die jeweilige Säure unter Rühren bei Raumtemperatur zugetropft. Das entstandene Salz fällt aus. Die Kurzcharakterisierung der Salze konzentriert sich hier auf die makroskopische Betrachtung, die Wärmeentwicklung bei der Salzbildung, die Filtrierbarkeit, die Ausbeute, den Schmelzpunkt (Abb. 21) sowie die mikroskopische Beschreibung der entstehenden Salze (Abb. 22).

Desoxypeganinsalz	Ausfällung	Reaktion	Filterierbarkeit	Ausbeute	Schmelzpunkt
Hydrochlorid	feiner, weißer Niederschlag	stark exotherm	gut	83%	258°C
Hydrogensulfat	feiner, weißer Niederschlag	stark exotherm	gut	85%	214-215°C
Hydrobromid	feiner, weißer Niederschlag	exotherm, nur geringe Wärmeentwicklung	gut	44%	263°C
Dihydrogenphosphat	sehr feiner, weißer Niederschlag	exotherm, nur geringe Wärmeentwicklung	schlecht	88%	248-249°C
Hydrogenmaleat	feiner, weißer Niederschlag	keine Wärmeentwicklung	gut	17%	Zersetzung
Citrat	zähe viskose Masse	keine Wärmeentwicklung	sehr schlecht	2%	Zersetzung
Mesilat	gelartige Masse	exotherm	sehr schlecht	5%	Zersetzung

Abb. 21: Kurzcharakterisierung der in Ethanol hergestellten Desoxypeganin- Salze.

Desoxypeganinsalz	Kristallform	Grösse min. in μm (Länge x Breite)	Grösse max. in μm (Länge x Breite)	Besonderheiten
Hydrochlorid	Vorwiegend Nadeln	50 x 10	300 x 20	Kantige Oberflächen; miteinander verzahnt
	Sehr geringe Anzahl Quader	nicht bestimmt	nicht bestimmt	
Hydrogensulfat	Vorwiegend Nadeln	10 x 2	50 x 10	Weitere Nadeln < 2 μm
	Vereinzelt Quader	10 x 5	50 x 40	
Hydrobromid	Ausschliesslich Nadeln	40 x 5-10	100 x 10	Sehr einheitliches Bild
Dihydrogenphosphat	Sehr feines Pulver ; vorwiegend Quader; die Grösse ist nur grob abschätzbar und wird auf kleiner als 5 μm geschätzt			
Tartrat	Sehr geringe Anzahl Nadeln	nicht bestimmt	nicht bestimmt	
	Quader	5 x 5	25 x 20	Sehr einheitliches Bild

Abb. 22: Mikroskopische Charakterisierung der Desoxypeganin (3) Salze (Suspensionen in Heptan) in einer Zählkammer nach Neubauer mit 256-facher Vergrösserung.

Die Betrachtung der Ergebnisse zeigt, wie unterschiedlich die Salzherstellung mit verschiedenen Säuren ist. Alle aufgeführten Parameter beeinflussen in irgendeiner Weise die weitere Entwicklung des Wirkstoffes. Die Schmelzpunkte liegen alle über 200°C, so dass Probleme bei der technologischen Verarbeitung hinsichtlich energetisch hoher Verarbeitungsschritte wie Mahlen oder Verpressen nicht zu erwarten sind. Die Grösse der Kristalle ist entscheidend für das direkte Verpressen zu Tabletten (Direkttablettierung). Davon hängt u.a. das Schüttvolumen, die Fliesseigenschaften und die Entmischungstendenz ab. Natürlich können sämtliche Eigenschaften durch Veränderungen der Herstellungsvorschrift und weiterer Arbeitsschritte wie Mahlen und Klassieren beeinflusst werden.

9.2. Direkttablettierung von Desoxypeganin-Salzen

Die Tablette stellt immer noch die wichtigste Arzneiform dar. Sie ist kompakt, ökonomisch, in grosser Stückzahl herzustellen und sehr einfach für den Patienten einzunehmen. Die Direkttablettierung, also ohne vorherigen Granulierungsschritt, stellt dabei besondere Anforderungen an den Wirkstoff und die Rezeptur. Am Besten sind quaderförmige Kristalle direkt zu verpressen, da hier die Fliessfähigkeit des Haufwerkes am grössten ist. Sehr kleine Kristalle zeigen eine Entmischungstendenz im Haufwerk und verhindern so eine genaue Dosierung. Der Wirkstoff muss ausreichend plastisch verformbar sein und eine nötige physikalische und chemische Stabilität aufweisen. Die Salze, welche in Abbildung 22 beschrieben sind, werden mit einer Standard-Tabletten-Rezeptur vermischt und zu Tabletten verpresst. Dabei soll die Dosierung 250 mg betragen. Die Verpressbarkeit, die auftretenden Problematiken sowie die makroskopische Beurteilung der Tabletten soll hier kurz beschrieben werden.

Die Standard-Tabletten-Rezeptur besteht aus Tablettose[®], Aerosil[®], Magnesiumstearat und Desoxypeganin (3). Tablettose[®] ist ein Markenname für agglomerierte Lactosen (α -Lactose-Monohydrat gemäss Ph. Eur. und USP) in unterschiedlichen Grössen. Sie wurde speziell für die Direkttablettierung entwickelt und verbindet die gute Fliessfähigkeit einer grobkörnigen Lactose mit der Verpressbarkeit einer fein gemahlenen Lactose. Daraus folgt eine hervorragende Härtestabilität. Dies führt zu einem konstanten Zerfall der Tabletten und damit auch zur konstanten Freisetzung des Wirkstoffes. Magnesiumstearat wird als Schmiermittel und Formtrennmittel und Aerosil[®] als Fliessregulierungsmittel eingesetzt. Es werden Tabletten mit einem Durchmesser von 8 mm mit einer automatischen Exzenterpresse hergestellt. Bei solch einem hohen Wirkstoffgehalt ist das Pulvervolumen ohne Granulierung sehr gross. Die Tabletten müssen teilweise nach dem ersten Pressvorgang nochmals gebrochen werden, um dieses Material dann nochmals einzusetzen. Während des Pressvorganges werden schnell die Unterschiede zwischen den einzelnen Salzen sehr deutlich. Die Probleme lagen in der Fliessfähigkeit der Haufwerke und teilweise im Deckeln der Tabletten. Ein Deckeln der Tabletten wird verursacht durch unterschiedliche Eigenschaften des Tablettiergutes sowie durch technische Faktoren. Einige Eigenschaften sind z.B. zu hoher Feuchtigkeitsgehalt, Luftadsorption oder zu geringe Kohäsionskräfte der Tablette, um den Ausstoß aus der Matrize unbeschadet zu überstehen [143]. Die meisten Probleme traten bei den Salzen der Weinsäure, Phosphorsäure und der Schwefelsäure auf. Das Desoxypeganin-Hydrobromid und -Hydrochlorid liessen sich am unproblematischsten verpressen und die Tabletten zeigten eine einheitliche Oberfläche. Diese beiden Salze sollen im Weiteren genauer charakterisiert werden und mit ihnen eine Optimierung der Salzherstellung erfolgen.

9.3. Optimierung der Herstellung von Desoxypeganinhydrochlorid und Desoxy-peganinhydrobromid

Um die Salzherstellung zu optimieren, wurden eine Reihe organischer Lösemittel ausprobiert. Von diesen zeigte Aceton anstelle von Ethanol die besten Ergebnisse. Aceton wurde auf 50°C erwärmt und eine konzentrierte Desoxypeganin (3) Lösung hergestellt. In diese Lösung wurde die Säure dann zugetropft. Da Aceton einen Siedepunkt von 56,2°C hat, war es nicht möglich, den Schmelzpunkt von Desoxypeganin (3) (86-87°C) zu überschreiten, was zum Aufrahmen der Base führen würde. Die weiteren Arbeitsschritte blieben unverändert.

Nach ¹H-NMR spektroskopischer Wasserbestimmung konnten dem Hydrochlorid zwei Moleküle Kristallwasser und dem Hydrobromid ein Molekül Kristallwasser zugeordnet werden.

9.4. „Direktablettierungsversuche“ mit den optimierten Desoxypeganin-Salzen

Die Tablettenrezeptur wurde beibehalten. Alle Tabletten mussten nach dem ersten Verpressen gebrochen werden, um sie dann nochmals zu verarbeiten. Das Volumen des Haufwerkes ist sehr gross und das Tablettengewicht und damit die Dosierung von 250 mg Desoxypeganin (3) kann ansonsten nicht erreicht werden. Die Fließfähigkeit ist dadurch wesentlich verbessert und die Problematik des Deckelns ist bei den Tabletten der drei Salze (zwei Chargen Desoxypeganin-HCl, eine Charge -HBr) bis auf ein Minimum reduziert worden. Die derart hergestellten Tabletten zeigen bei der makroskopischen Betrachtung eine einheitliche Oberfläche und ein stabiles Äusseres.

Neben der Bestimmung der Bruchfestigkeit spielt der Zerfall einer Tablette eine besondere Rolle. Als Vortest kann die Tablette in 37°C warmen Wasser durch leichtes Umschwenken gelöst werden. Das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur.) fordert bei nichtüberzogenen Tabletten eine Zerfallszeit von maximal 15 Minuten.

Die Friabilität wurde nach Ph. Eur. mit einer Friabilitätsapparatur bestimmt und der Abrieb sollte dabei nicht über 1% betragen.

Die Gleichförmigkeit der Masse wurde nach Ph. Eur. bestimmt und sollte bei Tabletten mit einem Gewicht grösser als 250 mg maximal um 5 % vom geforderten Gewicht abweichen (Abb. 23).

Desoxypeganin-Salze	Durchschnitts-masse	Bruchfestigkeit	Friabilität	Zerfall
Hydrochlorid I	411 mg	100 N	0,5%	7 Min.
Hydrochlorid II	415 mg	80 N	3%	10 Min.
Hydrobromid	415 mg	76 N	1,1%	12 Min.

Abb. 23: Charakterisierung der aus den optimierten Salzen hergestellten Tabletten.

Die Gleichförmigkeit der Masse und damit auch die richtige Dosierung wird von allen Tabletten erfüllt. Ebenso erfolgt der Zerfall in diesem Vortest innerhalb von 15 Minuten. Die Bruchfestigkeit liegt mit 100 N in einem akzeptablen Rahmen. Auch die Friabilität der Tabletten des Hydrochlorids I ist sehr gering (0,5 %) und zeigt mit einer geringen Zerfallsdauer von nur sieben Minuten, dass für den Pressvorgang geeignete Bedingungen gefunden worden sind.

Die Tabletten des Hydrobromids sind mit den entsprechenden Parametern etwas ungünstiger einzuordnen. Hingegen zeigen die aus dem Hydrochlorid II hergestellten Tabletten einen deutlich vergrößerten Abrieb, was offensichtlich mit der veränderten und uneinheitlichen Kristallform zusammenhängt.

9.5. Schlussfolgerung aus der Direkttablettierung und der Salzherstellung

Wie die letzten Abschnitte gezeigt haben, weisen die einheitlich hergestellten Salze doch erhebliche Unterschiede in ihren Eigenschaften auf. Selbst mit einfachen Verfahren lassen sich eine Reihe von Informationen sammeln, die sich dann miteinander vergleichen lassen. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich sowohl das Hydrochlorid als auch das Hydrobromid einfach herstellen lassen und die Eigenschaften der Salze sogar die Direkttablettierung zulassen. Hydrochloride sind im Allgemeinen sehr gut verträglich (Salzsäure ist physiologisch im Magen) und sind auch deshalb am weitesten verbreitet. Hydrobromide nehmen nach den (Hydrogen-)Sulfaten den dritten Platz ein. Diese Salze weisen oft eine geringere Löslichkeit und einen höheren Kristallinitätsgrad als die entsprechenden Hydrochloride auf. Bei einer geschätzten Dosis an Desoxypeganin (3) von 50 - 100 Milligramm pro Tag werden entsprechend viele Bromidionen dem Körper zugeführt. Die mögliche Akkumulation könnte dann zu Bromismus führen und Schläfrigkeit, Gedächtnisschwund, Verwirrtheit, Akne- und Furunkelbildung zur Folge haben.

10. Transdermale Therapeutische Systeme (TTS) mit Desoxypeganin als Wirkstoff

Transdermale Therapeutische Systeme (TTS) sind wirkstoffhaltige Pflaster, die den Wirkstoff über die Haut in das darunter liegende Gewebe und die Blutgefäße abgeben. Die Vorteile gegenüber herkömmlichen Darreichungsformen, die über den Magen-Darm-Trakt permeieren, sind offensichtlich. Die Wirkstoffe unterliegen nicht dem First-Pass-Metabolismus, da sie die erste Leberpassage umgehen. Dadurch kann die Dosierung vermindert werden und die Gefahr einer Über- oder Unterdosierung bei gleichem oder verbessertem therapeutischen Effekt wird praktisch ausgeschlossen. Man erzielt mit transdermalen Systemen einen über längere Zeit gleichbleibenden Blutspiegel, wobei Wirkstoffspitzen vermieden werden.

Die Darreichungsform TTS ermöglicht wegen des einfachen Aufkleben und Ablösen des Pflasters von der Haut eine relativ exakte Bestimmung der Anwendungsdauer. Es bildet sich zwar ein gewisses Arzneistoffdepot in der Haut, welches nach dem Entfernen des Pflasters noch „aufgebraucht“ werden muss. Man fällt aber relativ schnell unter die therapeutische Dosis.

Über den Aufbau des Pflasters lässt sich die Dosis pro Zeiteinheit steuern und Dosierungsvorschriften können vom Patienten exakt befolgt werden. Die Wirkdauer von Arzneistoffen mit kurzer biologischer Halbwertszeit kann durch die Applikation eines TTS verlängert werden. Die Nebenwirkungen können vor allem bei hochpotenten Arzneistoffen mit geringer therapeutischer Breite reduziert werden. Nachteile der TTS sind ebenso zu nennen. Arzneistoffe, die zu Hautirritationen oder Sensibilisierung führen, sind nicht geeignet. Ausserdem können Allergien auf Bestandteile der in den TTS verwendeten Klebern und/oder Enhancern auftreten. Die Hautflora kann beeinflusst und die Haut geschädigt werden [144,145,146].

Auf dem weltweiten Arzneimittelmarkt gibt es derzeit neun verschiedene Arzneistoffe, die mittels TTS verabreicht werden können. Die Indikationsgebiete reichen von der Raucherentwöhnung, Schmerzbehandlung, Behandlung der Hypertonie bis hin zu Kombinationspräparaten zur Kontrazeption. Der jährliche US-Markt für TTS beträgt mehr als 3 Milliarden Dollar [147].

Ein Arzneistoff, der für eine TTS-Therapie in Frage kommt, muss bestimmte physikalische und chemische Eigenschaften erfüllen. Dazu zählt eine niedrige Molekularmasse (< 500 Da), eine hohe Lipophilie und gleichzeitig eine gewisse Löslichkeit in wässrigen Medien. Da die Grösse eines TTS begrenzt ist, muss der wirksame Plasmaspiegel eines Arzneistoffes im Bereich von ng/ml liegen [148,149]. Dabei stellt Nikotin mit einer Molekularmasse von 162 Da das kleinste und Oxybutinin mit 359 Da das grösste Wirkstoffmolekül dar. Die Pflastergrösse variiert von $2,5 \text{ cm}^2$ bei Scopolamin und Fentanyl bis 140 cm^2 bei einem TTS mit dem Arzneistoff Lidocain. Die Abgabe des Arzneistoffes aus dem TTS schwankt von 0,01 mg pro Tag bei Östradiol bis 32 mg in 12 Stunden bei Lidocain. Desoxypeganin (3) erfüllt die eben genannten physikalischen und chemischen Eigenschaften. Der ausgeprägte Metabolismus (Kapitel 8.6., Theoretischer Teil) kann durch Umgehung des First-Pass-Effektes minimiert werden, so dass eine Dosisreduktion bis in den niederen mg-Bereich möglich ist. Daher erschien die transdermale Applikation des Wirkstoffes Desoxypeganin (3) besonders sinnvoll und die Entwicklung eines Pflasters folgerichtig.

10.1. Hautaufbau und transdermalen Transport

Die Haut ist mit einer Fläche von $20\,000 \text{ cm}^2$ und einem Gewicht von ungefähr 3 kg das grösste Organ des Menschen. In erster Linie übt sie eine Schutzfunktion aus. Sie

verhindert das Eindringen von Fremdstoffen, Toxinen, Mikroorganismen und minimiert den Wasserverlust des Körpers. Die Haut zeigt in der Regel für Fremdmoleküle eine sehr geringe Permeabilität. Man kann sie in drei Schichten unterteilen: die Subcutis, die Dermis und die apikal liegende Epidermis (Abb. 24). Vor allem die äusserste Schicht der Epidermis, das Stratum corneum, stellt dabei die entscheidende Barriere dar. Das Stratum corneum besteht aus Hornschuppen (Korneozyten; enddifferenzierte Keratinozyten), die in multilamellare Lipidschichten eingebettet sind [148,149].

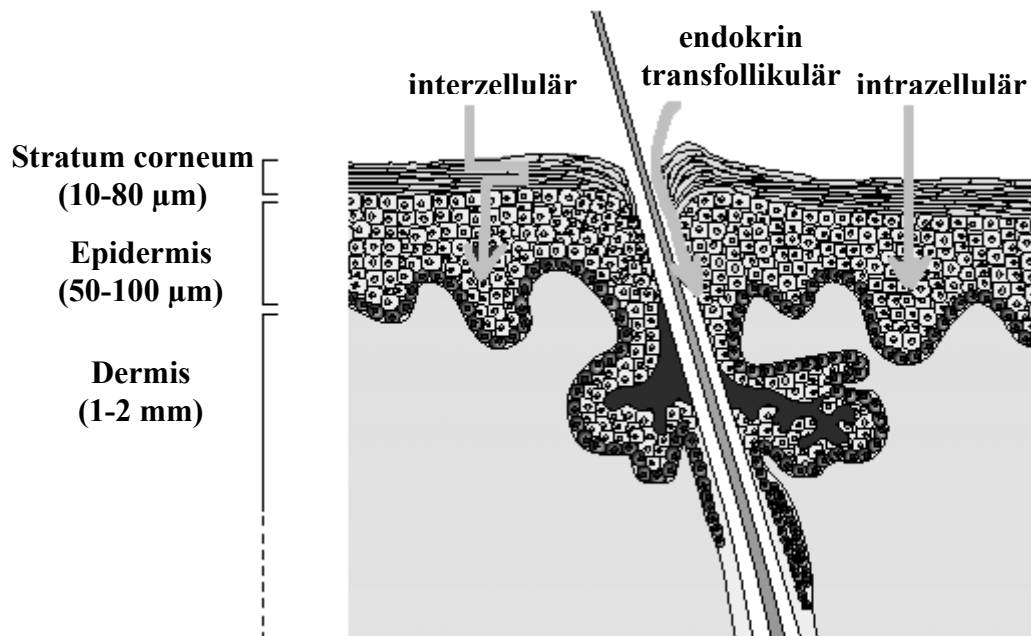


Abb. 24: Hautaufbau eines Menschen nach [149]. Stratum corneum (Korneozyten) als äusserste Schutzschicht; Epidermis mit vorwiegend Keratinozyten in unterschiedlichen Differenzierungsstadien; Dermis bildet mit ihren Fasern aus Kollagen, Elastin und Retikulin einen effektiven mechanischen Schutz, sie wird stark durchblutet und ist für die Elastizität der Haut verantwortlich. Ebenso sind die möglichen Permeationswege eines Arzneistoffes zu sehen (auch Abb. 25).

Die Stärke dieser Hautschicht ist durch die Anzahl der aufeinander gestapelten Korneozyten bedingt und variiert je nach Körperregion und Jahreszeit von 10 bis 80 μm [150]. Ohne das Stratum corneum würde der Mensch täglich 20 Liter Wasser transepidermal verlieren [151]. Bei intakter Barriere sind das nur 0,16 Liter pro Tag, dies entspricht $0,4 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ [152].

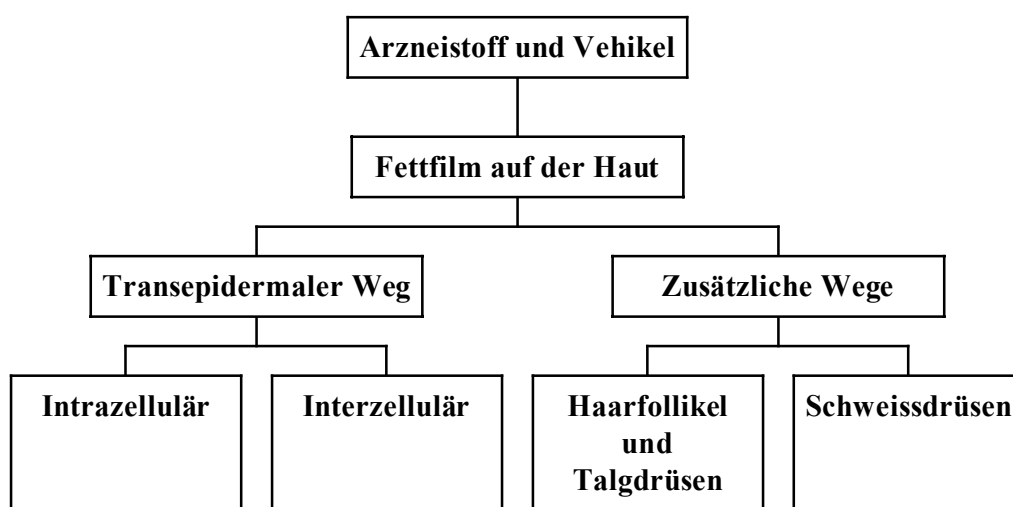


Abb. 25: Mögliche Permeationswege eines Arzneistoffes durch die Haut [148].

Die Haut stellt aber keine völlig impermeable Schicht für exogene Stoffe dar, denn Arzneistoffe können über verschiedene Wege transkutan aufgenommen werden (Abb. 25). Der Arzneistoff kann also abhängig von seinen Eigenschaften intra- oder interzellulär aufgenommen werden. Welcher dieser beiden Wege eingeschlagen wird, hängt u.a. von der Löslichkeit des Arzneistoffs, seinem Verteilungskoeffizienten und seinem jeweiligen Diffusionskoeffizienten ab. Die Aufnahme über Haarfollikel, Talg- oder Schweissdrüsen sollte bei 0,1 % der gesamten Hautoberfläche quantitativ keine grosse Rolle spielen.

10.2. Membran- und Matrixpflaster

Membransysteme bestehen aus einer undurchlässigen Trägerschicht, einem Wirkstoffreservoir, einer Steuermembran und einer zusätzlichen Kleberschicht. Das Wirkstoffreservoir, in dem der Wirkstoff im Allgemeinen suspendiert vorliegt, befindet sich zwischen Trägerschicht und Steuermembran. Die Steuermembran bestimmt die Geschwindigkeit der Wirkstofffreigabe (membrankontrollierte Freisetzung). Diese Pflaster zeichnen sich durch eine relativ konstante Liberation aus. Bei mechanischer Verletzung der Steuermembran kann es passieren, dass der Wirkstoff schlagartig freigesetzt wird (dose-dumping).

Matrikdiffusionskontrollierte Systeme sind einfacher aufgebaut (Abb. 26). Der Arzneistoff ist dabei in gelöster oder homogen dispergierter Form in einer Matrix eingebettet.

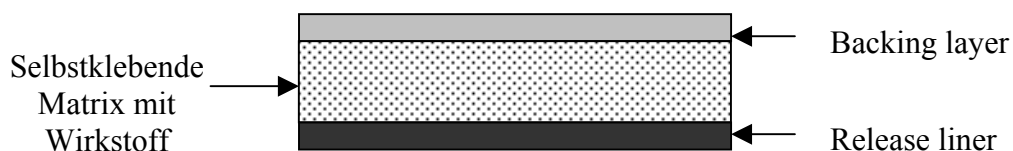


Abb. 26: Schema eines matrikdiffusionskontrollierten Systems.

Das Pflaster enthält keine zusätzliche Kontrollmembran. Die Freigabe aus diesen Systemen wird durch die Diffusion des Wirkstoffes durch das Matrixmaterial kontrolliert. Die Wirkstofffreigabe ist nicht immer zeitkonstant. Ein dose-dumping kann hier nicht auftreten, so dass bei hochpotenten Arzneistoffen das Matrixpflaster als

sicherer gilt. Kurz vor der Anwendung wird der Release liner entfernt und die selbstklebende Matrix mit Wirkstoff und dem Backing layer auf die Haut geklebt.

Bei der Entwicklung eines TTS für Desoxypeganin (3) wählten wir matrixdiffusionskontrollierte Systeme. Es wurden Formulierungen mit verschiedenen Matrices und unterschiedlichen Enhancern hergestellt. Diese wurden dann in einem Permeationstest auf humaner Vollhaut getestet und die Freisetzung der verschiedenen Formulierungen miteinander verglichen.

10.3. TTS-Formulierungen von Desoxypeganin

Insgesamt wurden 16 verschiedene Formulierungen mit Desoxypeganin (3) hergestellt. Dabei variierte der Wirkstoffgehalt von 5 – 12 %. Insgesamt wurden drei unterschiedliche Matrices und drei Enhancer in verschiedenen Konzentrationen verwendet.

10.3.1. Selbstklebende Matrices

Es wurden 2 Polyacrylatkleber als Matrix eingesetzt, die in der weiteren Beschreibung als Durotak 1 (DuroTak[®] 387-2054) und Durotak 2 (Durotak[®] 387-2516) bezeichnet werden. Diese Kleber sind drucksensitive, selbstklebende Polymere der Polyacrylsäure und werden durch radikalische Polymerisation verschiedener Monomere in einem organischen Lösungsmittel hergestellt. Dabei bilden sogenannte Kohäsions-Monomere wie Acrylsäure, Methacrylsäure oder Vinylacetat das Gerüst der Polyacrylatkleber. Adhäsions-Monomere wie n-Butylacrylat oder 2-Ethylhexylacrylat sind für die klebrigen Eigenschaften verantwortlich. Durotak 1 und Durotak 2 unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Monomere.

Die dritte Matrix besteht aus insgesamt acht verschiedenen Bestandteilen. Die wichtigsten Substanzen sind Ethylcellulose, Abitol[®] und Hercures[®] (jetzt Piccotac[®]). Abitol[®], ein technisch hergestellter Hydroabietylalkohol, ist ein farbloses, klebriges Harz. Hercures[®] ist ein aliphatisches C5-Harz. Im Weiteren wird diese Matrix als Abitol[®]/Hercures[®] bezeichnet.

10.3.2. Penetrationsförderung durch „Enhancer“

Chemische Penetrationenhancer können die Hautpermeation durch unterschiedliche Mechanismen steigern. Dazu zählten die Steigerung der Arzneistofflöslichkeit, die Erhöhung des Verteilungskoeffizienten im Stratum corneum sowie die Veränderung der geordneten interzellulären Lipiddoppelschicht des Stratum corneum (Abb. 27).

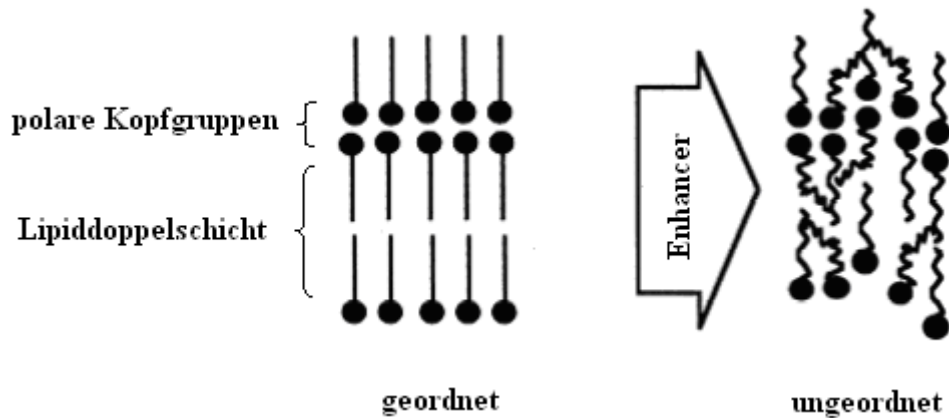


Abb. 27: Das Schema zeigt den Effekt eines Enhancers auf die Lipiddoppelschicht im Stratum corneum nach [156]. Dabei kann sich der Enhancer in die Nähe der polaren Gruppen oder zwischen die hydrophoben Ketten der Doppelschicht schieben. Der geordnete Aufbau wird verändert und ein Arzneistoff kann leichter das Stratum corneum passieren.

Diese Substanzen sollen nicht toxisch, nicht hautirritierend und nicht allergen sein, sowie keine pharmakologische Wirkung zeigen [149].

Die Liste der Enhancer ist lang und mittlerweile ist es möglich, sämtliche auf dem Markt befindlichen Enhancer sowie Kombinationen mit einem High-Throughput-Verfahren auf die Transdermale Permeation hin zu screenen [153]. Eine umfassende Betrachtung der verschiedenen Enhancer sowie deren genauen Wirkungsmechanismus ist der Literatur zu entnehmen [154-157]. Es werden hier als Enhancer Cetiol[®], Isopropylmyristat und Dodecanol eingesetzt.

10.3.3. Herstellung der TTS-Formulierungen von Desoxypeganin

Desoxypeganin (3) wird in der jeweiligen Matrix gelöst und je nach Formulierung der Enhancer zugetropft. Dann wird mit einem Rakel die Matrix auf den Release liner aufgetragen, das Lösungsmittel abgedampft und mit dem transparenten Backing layer kaschiert. Das Pflaster wird ausgestanzt, das Gewicht bestimmt und die Wirkstoffmenge pro Pflaster berechnet.

10.4. Experimenteller Aufbau des Permeationstests

Für Untersuchungen der Penetration oder Permeation eines Arzneistoffes aus einer Applikationsform wie einem TTS werden sogenannte Diffusionszellen verwendet. Solch eine Diffusionszelle besteht aus zwei Verteilungsräumen, welche durch eine Membran (z.B. Humanhaut) voneinander getrennt sind. Das TTS wird auf einen Hautstanzling geklebt und in die Diffusionszelle eingespannt. Aus diesem Donorkompartiment kann der Arzneistoff durch die Membran in das

Akzeptorkompartiment diffundieren. Die Akzeptorkammer ist dabei mit einem geeigneten Medium wie physiologischer Kochsalzlösung gefüllt. Die Kochsalzlösung wird dabei auf 32°C temperiert. Dies gewährleistet eine Durchflussanordnung mit Einzelthermostatisierung (Abb. 28) oder in unserem Falle durch ein thermostatisiertes Wasserbad.

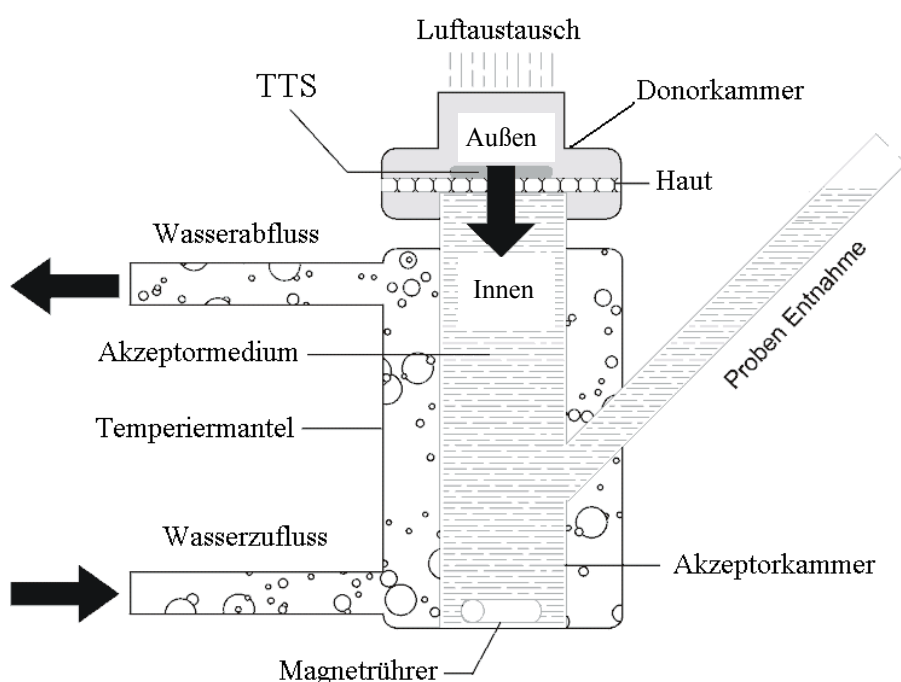


Abb. 28: Querschnitt einer modifizierten Diffusionszelle nach Franz [158].

Nach 4, 8, 24, 32 h wird das Akzeptormedium komplett ausgetauscht, um Sink-Bedingungen aufrecht zu erhalten. Die aufgearbeiteten Proben wurden dann per HPLC mit UV-Detektion (Methode A3) quantitativ ausgewertet.

Als Membran wurde in diesem Versuch weibliche humane Vollhaut (Epidermis mit Dermis) aus Brust- und Bauchreduktionen gewählt. Humanhaut ist nicht beliebig verfügbar und die Permeationsstrebweite ist je nach Alter, Geschlecht und

Körperregion sehr gross. In den letzten Jahren wurde aus diesen Gründen versucht, eine synthetische Haut („Living Skin Equivalents“) zu entwickeln [159,160]. Diese kommerziell erhältlichen Hautmodelle wie EpiskinTM, SkinethicTM oder EpiDermTM zeigen innerhalb einer Charge sowie zwischen mehreren Chargen eine gute Reproduzierbarkeit. Die Permeabilität ist allerdings im Vergleich zur Humanhaut viel zu hoch und erreicht keine realistische Annäherung [161,162]. Dieses in-vitro Permeationsmodell konnte sich daher nicht durchsetzen.

Der Verwendung von Tierhaut wie v.a. vom Schwein oder von haarlosen Meerschweinchen ist heutzutage auf die Präformulierungsphase beschränkt. Auch hier ist die Übertragbarkeit auf die menschliche Haut sehr schwierig und im Allgemeinen ist die Permeation bei der Tierhaut wesentlich höher [163].

Die Verwendung von isolierten Epidermen ist kritisch zu betrachten. Die sogenannte „shunt-diffusion“, die Diffusion durch Haarfollikel und Schweissdrüsen, täuscht dabei falsch positive Permeationsraten vor. Es bilden sich bei der Trennung der Epidermis von der Dermis sogenannte „shunt-holes“. Vor allem bei stark behaarter Haut kann dies kaum vermieden werden.

10.5. Permeationsergebnisse der TTS-Formulierungen

Von den 16 hergestellten Formulierungen wurden neun für den Permeationstest ausgewählt. Pflaster mit einer Wirkstoffkonzentration von 5 % Desoxypeganin (3) ohne Enhancer zeigten in Vorversuchen eine zu geringe Permeabilität. Formulierungen mit einer Konzentration von 12 % zeigten schon nach dem Abdampfen des Isopropanols deutliche Kristallbildung und konnten deshalb nicht im Permeationstest eingesetzt werden. Für alle übrigen Pflaster wurde die Permeationsrate an drei Hautstanzlingen

getestet. Von jedem Akzeptormedium wird der Wirkstoffgehalt bestimmt (Methode A3) und jeweils die kumulierte Konzentration pro Fläche Pflaster angegeben (Abb. 29).

Die Abitol[®]/Hercures[®]-Formulierung zeigte im Vergleich zur Polyacrylatmatrix eine achtfach höhere Permeationsrate. Mit der Abitol[®]/Hercures[®]-Formulierung ist es möglich, bei einer Pflastergrösse von 70 cm² eine Permeation von 20 mg pro Tag zu erreichen. Bei einer geschätzten Tagesdosis von 5 - 10 mg würde eine Pflastergrösse von 15 - 35 cm² für eine 24h Applikation ohne Weiteres ausreichen. Im Allgemeinen wird die tägliche systemische Dosis von 20 mg pro Tag als oberer limitierender Faktor angesehen [157] sowie eine Pflastergrösse von 200 cm². Dieses Pflaster haftete allerdings nicht so gut wie die Polyacrylatpflaster, so dass man in Zukunft mit einem Überpflaster mit einem zusätzlichen Kleberand arbeiten sollte.

10.6. Permeationsversuche mit Desoxyeganin-Salzen

Trotz sehr guter Permeationsergebnisse wollte man diese noch durch Tests weiterer Formulierungen steigern. Es konnte gezeigt werden, dass Salze anstelle der freien Base in einem TTS um ein Vielfaches besser permeieren [164,165]. Dabei wurden von der Base Morphin, Salze mit organischen Säuren hergestellt. Carbonsäuren mit Arylresten zeigten eine höhere Arzneistoffkonzentration im Akzeptormedium als Säuren mit Alkylresten. Im Gegensatz zu Salzen von anorganischen Säuren können diese organischen Säureadditionssalze als Ionenpaare um ein Vielfaches besser in die Haut penetrieren.

Formulierung	Matrix	Wirkstoffkonzentration	Enhancer	Kumulierte Werte in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 24 h, n=3	Kumulierte Werte in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 32 h, n=3
2	Durotak 1	7,5%	ohne Enhancer	6,3	13,3
3	Durotak 1	5%	5% Cetiol®	8,1	11,6
4	Durotak 1	5%	5% Isopropylmyristat	12,3	17,1
6	Durotak 1	7,5%	5% Isopropylmyristat	31,7	52,2
8	Durotak 2	7,5%	ohne Enhancer	8,1	12,4
11	Durotak 2	7,5%	5% Cetiol®	19,0	26,4
12	Durotak 2	7,5%	5% Isopropylmyristat	12,0	18,9
14	Durotak 2	7,5%	5% Dodecanol	26,7	36,1
15	Abitol/ Hercures®	10%	5% Isopropylmyristat	287	444

Abb. 29: Auswahl von 9 TTS-Formulierungen mit den Ergebnissen der Permeationstests auf Humanhaut. Dabei werden die kumulierten Desoxypeganin-Konzentrationen pro cm^2 Pflastergrösse nach 24 h und 32 h angegeben.

Sobald sie die Papillarschicht erreichen, werden die Ionen hydratisiert und dissoziieren.

In dieser Form werden sie leicht vom Blut abtransportiert, so dass sich kein Gleichgewicht an der lipophilen Epidermis bildet.

Um zu prüfen, ob dieser Effekt auch bei Desoxypeganin-Salzen auftritt, wurden die Salze der 4-Brombenzoesäure, Salicylsäure, Acetylsalicylsäure, Benzoesäure und Nikotinsäure hergestellt, in Olivenöl gelöst und die Permeation durch Humanhaut standardisiert auf Desoxypeganinbase (3) bestimmt (Abb. 30). Die Ergebnisse zeigen eine sehr starke Verringerung der Permeation für die Desoxypeganin-Salze (Methode **A3**). Was für Morphin hervorragend funktionierte, konnte für dieses Alkaloid nicht bestätigt werden. Die Permeation von Desoxypeganinbase (3) sollte aber für die Anwendung am Menschen ausreichen.

Desoxypeganin	Kumulierte Werte in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 24 h, n=3	Kumulierte Werte in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 32 h, n=3
Base	75,1	94,2
4-Brombenzoat	5,4	7,5
Salicylat	2,1	3,2
Acetylsalicylat	0,4	0,5
Benzoat	5,2	6,6
Nikotinat	1,2	1,8

Abb. 30: Permeationsmengen von Desoxypeganin-Salzen aus Olivenöl durch Humanhaut.

10.7. Permeationsversuche Desoxypeganin gegen Pegenon

Da Desoxypeganin (3) sehr schnell zu Pegenon (6) metabolisiert wird, könnte dem Metaboliten auch eine Wirkung zukommen: im Extremfall auch die Hauptwirkung. Deshalb wurde die Permeationsrate der Vollständigkeit halber gleich mitbestimmt.

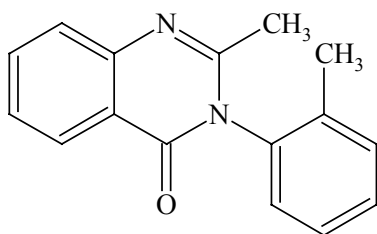
Die quantitative Auswertung dieses Versuches (Methode **A3**) zeigt, dass Pegenon (6) dreifach besser permeiert als Desoxypeganin (3) (Abb. 31).

	Kumulierte Werte in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 32 h, n=3	Kumulierte Werte in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 48 h, n=3	Kumulierte Werte in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 72 h, n=3
Desoxypeganin	67,5	87,1	107
Pegenon	239	289	327

Abb. 31: Permeation von Desoxypeganin (3) und Pegenon (6) durch Humanhaut.

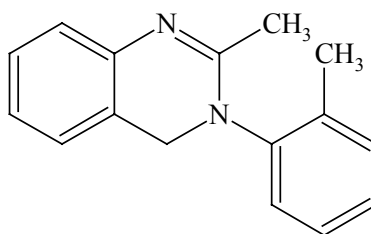
10.8. Permeationsversuche weiterer Dihydrochinazoline und Chinazolinone

Im Folgenden sollte herausgefunden werden, ob dieser Permeationsunterschied auch bei anderen Dihydrochinazolinen im Vergleich zu Chinazolinonen besteht. Die untersuchten Substanzen sind der Abbildung 32 zu entnehmen. Diese Substanzen sind kommerziell nicht verfügbar und wurden für die Permeationsversuche synthetisiert (Kapitel 9., Experimenteller Teil).



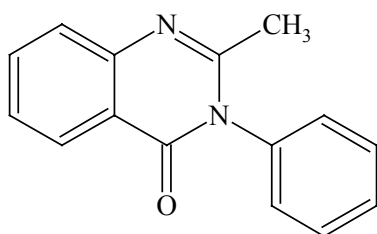
Methaqualon (10)

pK_a-Wert 2,14



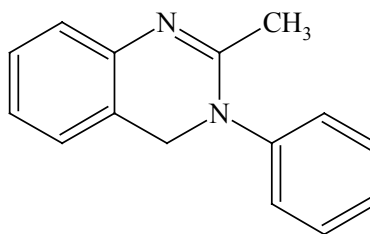
Huminal (11)

pK_a-Wert 8,67



2-Methyl-3-phenyl-chinazolin-4-on (12)

pK_a-Wert 2,14



2-Methyl-3-phenyl-3,4-dihydrochinazolin (13)

pK_a-Wert 8,67

Abb. 32: Übersicht Dihydrochinazoline und Chinazolinone (pK_a-Werte sind berechnet über ACD Software Solaris V4.76[©]).

Die quantitative Auswertung des Substanzpaares Huminal (11) (Methode **A5**) und Methaqualon (10) (Methode **A4**) zeigt im Mittelwert ungefähr eine vierfach bessere Permeation der oxidierten Verbindung. Anders sieht das Ergebniss bei dem Substanzpaar 2-Methyl-3-phenyl-3,4-dihydrochinazolin (13) (Methode **A6**) und 2-Methyl-3-phenyl-chinazolin-4-on (12) (Methode **A6**) aus. Obwohl sich die beiden Substanzpaare nur in einer Methylgruppe am Phenylring vom vorher betrachteten Paar unterscheiden (Abb. 32), sind doch deutliche Unterschiede in der Permeation zu sehen. Im Durchschnitt permeiert 2-Methyl-3-phenyl-chinazolin-4-on (12) dreizehnfach besser durch die Haut als 2-Methyl-3-phenyl-3,4-dihydrochinazolin (13).

Dieser Versuch zeigt uns, dass hier genau wie bei Desoxypeganin (3) und Pegenon (6) ein Permeationsunterschied besteht.

11. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war die umfassende Bearbeitung und Charakterisierung eines neuen Arzneistoffkandidaten von der Synthese über den Metabolismus bis zur Entwicklung von verschiedenen Darreichungsformen.

Desoxypeganin (3) konnte in einer zweistufigen Synthese hergestellt werden, welche die Erweiterung in den industriellen Maßstab ohne Arbeitsschritte wie Destillation oder Ausschüttelvorgänge zulässt. Die erste Stufe zum Zwischenprodukt Pegenon (6) wird durch Kristallisation direkt im Reaktanden, welcher zugleich als Lösungsmittel fungiert, gewonnen. Ohne Aufreinigung können die Kristalle sofort weiter in den Reduktionsschritt geleitet werden. Aufgrund des niedrigen Schmelzpunktes der Desoxypeganinbase (3) ist beim Alkalisieren durch den Vorgang des Aufrahmens die einfache Trennung der Desoxypeganinbase (3) von entstehenden anorganischen Salzen möglich. Die Umkristallisation aus demineralisiertem Wasser sowie die Neutralisierung der sauren mit der alkalischen Mutterlauge und der dabei resultierenden nicht toxischen Salze ist ein positiver und kostenarmer Effekt dieser Synthese. Chlorierte bzw. organische Lösungsmittel konnten vermieden werden.

Desweiteren wurde das Verhalten von Desoxypeganin (3) gegenüber Oxidantien untersucht und die Strukturen der entstehenden Oxidationsprodukte aufgeklärt. Weiterhin wurden in-vitro Metabolisierungsversuche mit Kaninchenleber durchgeführt und die drei Hauptmetabolite von Desoxypeganin (3) (Pegenon (6), Vasicinon (2) und Isovasicinon (9)) identifiziert und quantifiziert. Es wurden enzymkinetische Daten wie der V_{\max} -Wert (4,32 nmol/ min/ mg Protein bzw. 3,37 nmol/ min/ nmol CYP 450) sowie die Michaelis Konstante ($K_M = 5,8 \cdot 10^{-5}$ mol/l) bestimmt. Welches Isoenzym aus der CYP 450 Familie Desoxypeganin (3) metabolisiert, konnte über Substrate sowie

Inhibitoren der für die humane Biotransformation wichtigsten Isoenzyme mit humanen Lebermikrosomen gezeigt werden (Isoenzym CYP 2D6).

Die Herstellung einer Vielzahl von pharmazeutischen Salzen von Desoxypeganin (3) mit unterschiedlichen Methoden, der Charakterisierung dieser Salze sowie die anschliessende Direkttablettierung mit Beschreibung der Tabletten war der nächste Schritt in der umfassenden Betrachtung dieses Arzneistoffes. Es war uns möglich, die Wirkstoffmenge in der Tablette weit über das therapeutisch erforderliche Maß zu steigern.

Eine weitere Darreichungsform, das transdermale therapeutische System wurde entwickelt und Formulierungen mit verschiedenen Klebern und Enhancern hergestellt. Das jeweilige Permeationsverhalten des Wirkstoffes wurde an humaner Vollhaut bestimmt. Bei einer geschätzten Tagesdosis von 5 – 10 mg Desoxypeganin (3) würde eine Pflastergrösse von 15 – 35 cm² für eine 24 h Applikation ausreichen. Weitere Versuche mit Desoxypeganin-Salzen erbrachten keine weitere Erhöhung der Permeation.

Diese Arbeit zeigt eine umfassende Charakterisierung eines neuen Arzneistoffes und das Sammeln möglichst vieler Informationen aus den unterschiedlichsten Bereichen der Pharmazie, die für Phase I und II Studien zwingend sind und für weitere klinische Entwicklungen als Orientierung dienen können. Ob Desoxypeganin (3) am Ende wirklich die erhofften positiven Effekte in der Suchttherapie (oder in der Alzheimer-Krankheit) erbringt, werden die geplanten klinischen Studien zeigen.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeine Methoden und Materialien

1.1. Chromatographie

1.1.1. HPLC-Geräte

Analytische HPLC:

Pumpen/Controller:	Waters 600 E Waters LC Module I plus Hitachi L-7110
Detektoren:	Photodiodenarraydetektor Waters 991 Photodiodenarraydetektor Waters 996 Photodiodenarrayetektor Jasco UV 975
HPLC-Gerät:	Waters LC Module I plus
Autosampler:	Merck Hitachi AS-2000 A
Injektionsventil:	Rheodyne 7125 (20 µl)
Datenverarbeitung:	NEC Powermate 386/25 mit Waters 991 Software Waters Millenium TM Chromatography Manager Version 2.15 Chromeleon Version 6.40 der Firma Dionex
Schreiber:	Graphikplotter Waters 5200 Hewlett Packard Deskjet 610 C

Präparative HPLC:

Pumpe:	Waters Prep LC 4000 System
Controller:	Waters 4000

Detektor: Photodiodenarraydetektor Waters 990

Injektionsventil: Rheodyne 7010 (5 ml Schleife)

Datenverarbeitung: NEC APC IV

Schreiber: Graphikplotter Waters 990

1.1.2. Übersicht über die verwendeten HPLC-Systeme

Nr.	Stationäre Phase	Mobile Phase	Fluss	Detektion																					
A1	Bischoff Chromatography Prontosil C18-SH, 5 µm, 250 x 4,6 mm	A: Wasser B: Methanol isokratisch: 60% A, 40% B	1,2 ml/min	PDA: λ = 225 nm																					
A2	Bischoff Chromatography Prontosil C18-SH, 5 µm, 250 x 4,6 mm	A: Wasser B: Methanol Gradient: linear <table><tr><td>Zeit</td><td>A</td><td>B</td></tr><tr><td>[min]</td><td>[%]</td><td>[%]</td></tr><tr><td>0</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>10</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>50</td><td>10</td><td>90</td></tr><tr><td>51</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>60</td><td>90</td><td>10</td></tr></table>	Zeit	A	B	[min]	[%]	[%]	0	90	10	10	90	10	50	10	90	51	90	10	60	90	10	1,2 ml/min	PDA: λ = 225 nm
Zeit	A	B																							
[min]	[%]	[%]																							
0	90	10																							
10	90	10																							
50	10	90																							
51	90	10																							
60	90	10																							

A3	<p>YMC basic, 5 μm,</p> <p>250 x 4,6 mm</p>	<p>A: 0,05 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$</p> <p>B: Acetonitril</p> <p>C: Methanol</p> <p>mit Eisessig auf pH 4,2 eingestellt</p> <p>isokratisch:</p> <p>88% A, 6% B, 6% C</p>	1,2 ml/min	<p>PDA:</p> <p>$\lambda = 279 \text{ nm}$</p>
A4	<p>Phenomenex</p> <p>Synergi C12 Max-RP 80A,</p> <p>4 μm, 150 x 4,6 mm</p>	<p>A: 0,1 M HCOONH_4</p> <p>B: Methanol</p> <p>mit konz. Ameisensäure auf pH 5,0 eingestellt</p> <p>isokratisch:</p> <p>40% A, 60% B</p>	1,2 ml/min	<p>PDA:</p> <p>$\lambda = 220 \text{ nm}$</p>
A5	<p>Phenomenex</p> <p>Synergi C12 Max-RP 80A,</p> <p>4 μm, 150 x 4,6 mm</p>	<p>A: 0,1 M HCOONH_4</p> <p>B: Methanol</p> <p>mit konz. Ameisensäure auf pH 5,0 eingestellt</p> <p>isokratisch:</p> <p>60% A, 40% B</p>	1,2 ml/min	<p>PDA:</p> <p>$\lambda = 220 \text{ nm}$</p>

A6	Macherey & Nagel Nucleodur Gravity RP 18, 5 µm, 250 x 4,6 mm	A: 0,05 M CH ₃ COONH ₄ B: Acetonitril mit Eisessig auf pH 5,5 eingestellt isokratisch: 60% A, 40% B	1,2 ml/min	PDA: λ = 220 nm																					
P1	Bischoff Chromatography Prontosil C18-SH, 5 µm, 250 x 32 mm	A: Wasser B: Methanol Gradient: linear <table><tr><td>Zeit</td><td>A</td><td>B</td></tr><tr><td>[min]</td><td>[%]</td><td>[%]</td></tr><tr><td>0</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>10</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>50</td><td>10</td><td>90</td></tr><tr><td>51</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>60</td><td>90</td><td>10</td></tr></table>	Zeit	A	B	[min]	[%]	[%]	0	90	10	10	90	10	50	10	90	51	90	10	60	90	10	60 ml/min	PDA: λ = 225 nm
Zeit	A	B																							
[min]	[%]	[%]																							
0	90	10																							
10	90	10																							
50	10	90																							
51	90	10																							
60	90	10																							

1.2. Eingesetzte Materialien

1.2.1. Lösungsmittel

Für die analytische HPLC wurden Lösungsmittel der Firma Merck mit LiChrosolv[®] Qualität verwendet, präparative Trennungen wurden mit Lösungsmitteln der Qualität PrepSolv[®] der Firma Merck durchgeführt.

Wasser für die HPLC wurde über eine mit demineralisiertem Wasser gespeiste Reinstwasseranlage Seralpur PRO 90 C der Firma Seral mit Bakterien-Membranfilter Supor[®] DCF[™] CHS92DE 0,2 µm Porenweite (Fa. Gelman Sciences) gewonnen. Die Leitfähigkeit des Wassers lag bei Entnahme unter 2µS/cm.

1.2.2. Chemikalien

Die eingesetzten Chemikalien wie Edukte für präparative Synthesen wurden über die Firmen Fluka, VWR und Aldrich bezogen und hatten p.a. Qualität.

1.2.3. Haftkleber und sonstige Matrix-Bestandteile

Die eingesetzten Haftkleber hatten alle pharmazeutische Qualität und wurden von folgenden Firmen geliefert:

- Polyacrylate (DuroTak[®] 387-2054 und Durotak[®] 387-2516) von National Starch
- Harze (Abitol[®] und Hercures[®]) von der Firma Hercules

1.2.4. Folienmaterial

Folgendes Folienmaterial wurde eingesetzt:

- Polyethylenterephthalat, 100 µm Folienstärke, beidseitig silikonisiert und mit Aluminium bedampft (Hostaphan[®] RN 100) der Firma Mitsubishi Polyester Film als Release liner
- Polyethylenterephthalat, 23 µm Folienstärke, transparent (Hostaphan[®] RN 23) der Firma Mitsubishi Polyester Film als Backing layer

1.3. Schmelztemperaturen

Die Schmelztemperaturen (°C) wurden mit einem Heiztischmikroskop HM-LUX der Firma Leitz ermittelt und sind unkorrigiert wiedergegeben.

1.4. Spektroskopie

1.4.1. NMR-Spektren

Die Aufnahmen erfolgten mit einem Spektrometer JEOL[®] Eclipse+ 500 (¹H = 500 MHz). Die Werte der chemischen Verschiebung sind in ppm angegeben und beziehen sich auf die δ -Skala. Die Kalibrierung erfolgte auf das Lösungsmittelsignal.

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

s = Singulett	d = Dublett	t = Triplett
q = Quartett	m = Multiplett	br = breites Signal

Die Bearbeitung der Spektren erfolgte mit den Programmen NUTS (NMR Data Processing Program) der Firma Acorn NMR, 2D-Version 5.084 und Delta V 4.1 der Firma Jeol. Die Abschätzung der chemischen Verschiebung (¹³C-Daten) der gemessenen Spektren erfolgte anhand einer Datenbank über das Internet (<http://www.nmrshiftdb.org>).

Die Abkürzungen der zum Einsatz gekommenen NMR-Experimente sind nachfolgend aufgelistet:

¹ H-NMR	vollständig gekoppeltes ¹ H-Kernresonanzspektrum
¹³ C-NMR	breitbandentkoppeltes ¹³ C-Kernresonanzspektrum
COSY	Correlation Spectroscopy

1.4.2. Massenspektrometrische Bestimmungen

ESI-Messungen

Diese Messungen erfolgten mit einem doppeltfokussierenden (EBE-Geometrie) VG Autospec-Massenspektrometer der Firma Micromass.

LC-MS-Messungen

Diese Messungen wurden mit einem Quadrupol-Particle-Beam-Massenspektrometer MD 800 der Firma Fisons durchgeführt, gekoppelt mit einem Waters LC Module I Plus HPLC-Gerät mit integriertem Autosampler. Die Datenverarbeitung erfolgte mit der Software MassLab Version 1.3.

LC- Cl^+ -MS: Ammoniak als Reaktandgas.

LC-EI-MS: Elektronenenergie von 70 eV.

Hochaufgelöste Massenspektren

Diese Messungen wurden mit einem Massenspektrometer VG Autospec der Firma Micromass (ESI-HR-MS) durchgeführt.

1.4.3. Infrarotspektren

Die Infrarotspektren wurden mit einem FT-IR-Spektrometer Typ 510P der Firma Nicolet aufgenommen. Die Lage der charakteristischen Banden ist in cm^{-1} angegeben. Alle Proben wurden als KBr-Presslinge mit 0,5 Gew% an Substanz vermessen.

1.4.4. Elektronenspektren

Die Aufnahmen der Elektronenspektren wurden mit dem UV-VIS-Photometer UV-2101 PC der Firma Shimadzu sowie den Photodiodenarraysystemen 991 und 996 der Firma Waters in der jeweiligen mobilen Phase (HPLC) durchgeführt unter Verwendung der entsprechenden Software.

1.5. Geräte für die präparative Synthese von Pegenon und Desoxypeganin

Reaktionsgefäß:	30 l oder 50 l Chromstahlgefäß der Firma Merck
Heizquellen:	Heizplatte KP515 1500 W der Firma AKO Heizband Typ Pilz 4634 1200 W der Firma Heraeus-Wittmann Wasserbad 5KW/380V der Firma Willy A. Bachofen mit Thermostat Typ 5602 der Firma Landis & GVR
Rührpistolen:	Typ E60 17 W der Firma Heidolph Elektro KG IKA Typ RW 018 der Firma Janke & Kunkel KG
Rührer:	Chromstahlgiterrührer Breite 22,5 cm und Höhe 10 cm Chromstahlgiterrührer Breite 31 cm und Höhe 7 cm
Filter:	Kolliertücher aus Baumwolle Millidisk TM Cartridge Filter (Porenweite 0,22 µm) der Firma Millipore Papierrundfilter ø 150 mm Typ 595 (=feinkristallin) der Firma Schleicher & Schüll
Vakuumpumpe:	Typ 3 EKF 63 der Firma Greiffenberger Antriebstechnik GmbH Marktredwitz (ABM)

1.6. Gerät für Mikrowellenversuche

Diese Versuche wurden mit einem handelsüblichen Mikrowellengerät Typ RE-515 D/TD der Firma Samsung bei 425 Watt oder 850 Watt durchgeführt.

1.7. Geräte für Biotransformationsversuche

Homogenisator: Ultra-Turrax Typ T45 der Firma Janke & Kunkel KG

Inkubator: Laborschüttelbad Typ W19 mit Thermostat Typ D1 der Firma
Haake

Zentrifuge: AvantiTM J-25 der Firma Beckman Coulter

Digifuge 2100 der Firma Heraeus

Über-Kopf-Schüttler: Rotary Mixer Typ 34526 der Firma Cenco

1.8. Mikroskopische Untersuchung der Desoxypeganin-Salze

Eine Spatelspitze eines jeden Desoxypeganin (3) Salzes wurde in Heptan suspendiert, auf eine Zählkammer nach Neubauer aufgetragen und mit einem Mikroskop Typ Standard RA der Firma Zeiss bei 256-facher Vergrößerung mikroskopisch charakterisiert.

1.9. Tablettenherstellung und Charakterisierung

Tablettenherstellung: Komprimiermaschine Typ KP2 der Firma VEB Kombinat Fortschritt Landmaschinen; 20 g Desoxpeganin (3) Salz wurden verpresst.

Durchschnittsmasse: Präzisionswaage Typ AdventurerTM der Firma Ohaus; 10 Tabletten wurden mit einem Pinsel von losem Feststoff befreit, das Gewicht bestimmt und der Mittelwert berechnet.

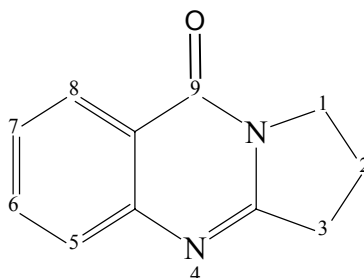
Bruchfestigkeit: Bruchfestigkeitstester Typ TBH 30 der Firma Erweka; von 5 hergestellten Tabletten wurde die Bruchfestigkeit bestimmt und der Mittelwert berechnet.

Friabilität: Friabilitäts-Apparatur Typ TAR 20 der Firma Erweka; 20 hergestellte Tabletten wurden in dieser Apparatur 100 mal gedreht, mit Druckluft die einzelnen Tabletten von losem Feststoff befreit, gewogen und der Abrieb in % berechnet.

Zerfall: 5 Tabletten wurden in 500 ml 37°C warmen demineralisierten Wasser gegeben, jede Minute das Becherglas per Hand umgeschwenkt und die Zeit in Minuten bis zum Zerfall aller 5 Tabletten gemessen.

2. Arbeitsvorschriften zur Herstellung von Desoxypeganin (3)

2.1. Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Zwischenstufe Pegenon (6)



2,3-Dihydropyrrolo[2,1-b]chinazolin-9-on (6)

14 l 2-Pyrrolidinon (5) (184 Mol) wurden auf 105°C erhitzt und unter Rühren innerhalb von 2 h 10 kg Isatosäureanhydrid (4) (61,3 Mol) langsam eingestreut. Dann wurde der Ansatz zügig auf 155°C erhitzt und 4 h bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde der Ansatz für 15 Minuten auf 175°C erhitzt und dann unter Rühren auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Reaktionsgefäß wurde luftdicht verschlossen. Pegenon (6) benötigte für eine komplette Auskristallisation 3 Tage. Das überschüssige 2-Pyrrolidinon (5) wurde durch Abtropfen von den hellbraunen Pegenon (6) Kristallen entfernt (Dauer ca. 1 Woche). Diese Qualität wurde für die Weiterreaktion verwendet. Es erfolgte eine Umkristallisation einer geringen Menge Pegenon (6) für analytische Zwecke aus Diethylether.

Ausbeute: 5,4 kg beigefarbene Pegenon (6) Kristalle mit einer Reinheit von 85% (m/m) (40%) mit 15% eingeschlossenem 2-Pyrrolidinon (5)

Schmelzpunkt: 110°C, hellgelbe Kristalle aus Diethylether (Lit.[67]: 110-111°C)

UV: λ_{max} ACN: 203, 223, 266, 303, 315 nm

$^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4 , 500 MHz), δ (ppm):

8,12 (d, 1 H, C-8-H)
7,75 (t, 1 H, C-6-H)
7,53 (d, 1 H, C-5-H)
7,42 (t, 1 H, C-7-H)
4,13 (t, 2 H, C-1-H)
3,11 (t, 2 H, C-3-H)
2,23 (m, 2 H, C-2-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4 , 125 MHz), δ (ppm):

162,51 (C-9)	162,29 (C-3a)	150,01 (C-4a)
135,56 (C-8)	127,48 (C-7)	127,19 (C-6)
127,06 (C-5)	121,24 (C-8a)	47,93 (C-1)
33,15 (C-3)	20,23 (C-2)	

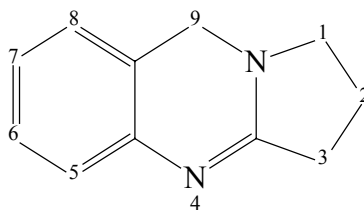
IR (KBr), ν (cm^{-1}): 1676, 1624, 1466, 1425, 1385, 1335, 1284, 1270, 1022, 871, 771, 741, 694, 613, 519

MS (ESI, MeOH): $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$ (186)
 ES^+ : 187 (100 $[\text{M}+\text{H}]^+$)

Massenfeinbestimmung (ESI-HR-MS):

berechnet: 187.087138 für $[\text{M}+\text{H}]^+$
gefunden: 187.089783

2.2. Arbeitsvorschrift zur Herstellung von Desoxypeganin (3)



1,2,3,9-Tetrahydropyrrolo[2,1-b]chinazolin (3)

2,15 kg hellbraune Pegenon (6) Kristalle (1,82 kg Pegenon (6) rein, 9,81 Mol) aus Kapitel 2.1., Experimenteller Teil, wurden in 6,1 l Essigsäure (106,7 Mol) bei 50°C gelöst. Innerhalb von 1 h wurden 3,7 kg Zinkstaub (56,6 Mol) langsam eingestreut und diese Suspension für eine weitere Stunde bei 50°C gerührt. In den nächsten 2 h wurden insgesamt 12 l HCl conc. (121,7 Mol) in gleichmässigen Abständen zugegeben. Nach kompletter Säurezugabe wurde nach weiteren 2 h der Reaktionsansatz durch Filtration über Baumwollkoltücher vom überschüssigen Zinkpulver befreit. Nach 12 h waren 3,7 kg Desoxypeganintetrachlorozinkat auskristallisiert, was einer Ausbeute von 70 % (m/m) entsprach. Abdampfen der Mutterlauge bei Raumtemperatur mit erneuter Auskristallisation resultierte in einer nahezu 100 %-igen Ausbeute. Die gelben Kristalle konnten mittels Dekantieren von der Mutterlauge separiert werden.

2,5 kg Desoxypeganinterachlorozinkat Kristalle (6,6 Mol) wurden in 11 l kochendem demineralisiertem Wasser gelöst und vorsichtig insgesamt 8,0 kg Natriumhydroxid-Plätzchen (200 Mol) zugegeben. Durch den stark exothermen Neutralisationsvorgang schmilzt Desoxypeganinbase (3) und rahmt als braune ölige Flüssigkeit auf. Nach dem Abkühlen erstarrte die Base und konnte so im Ganzen von der Lösung separiert werden. Anschließend wurde die Base eine Woche bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Auswaage betrug ungefähr 950 g bei 95 %-iger Reinheit (m/m). Das entsprach 80 % Ausbeute bezogen auf die reine Base.

300 g so gewonnene Desoxypeganinbase (3) (1,65 Mol) wurden in 28 l demineralisiertem Wasser bei 60°C innerhalb von 1 h gelöst. Dieser Ansatz wurde durch Anlegen eines Vakuums über eine Filterpatrone filtriert und der Ansatz im Wasserbad auf 40°C abgekühlt. In diese Lösung wurden 6 l 10 M Natronlauge (62,5 Mol) unter Rühren zugegeben. Desoxypeganin (3) fiel als weisser Feststoff aus und konnte über einen Büchner-Trichter mit Papierfilter durch Anlegen eines Unterdruckes filtriert werden. Mit +8°C kaltem demineralisiertem Wasser wurde sorgfältig nachgewaschen. Der weisse Feststoff wurde bei 50°C getrocknet und man erhielt 250 g Desoxypeganinbase (3) mit einem halben Kristallwasser.

Ausbeute: Σ 1,2 kg Desoxypeganin (3) $\cdot \frac{1}{2}$ H₂O mit einer Reinheit von >99,9% (m/m) (67 %)

Schmelzpunkt: 87°C, farbloses Pulver (Lit.[84]: 87-88°C)

UV: λ_{\max} ACN: 226, 301 nm

¹H-NMR (MeOH-d₄, 500 MHz), δ (ppm):

7,09 (t, 1 H, C-6-H)

6,93 (t, 1 H, C-7-H)

6,88 (m, 2 H, C-5/8-H)

4,48 (s, 2 H, C-9-H)

3,27 (t, 2 H, C-1-H)

2,52 (t, 2 H, C-3-H)

1,97 (m, 2 H, C-2H)

^{13}C -NMR (MeOH- d_4 , 125 MHz), δ (ppm):

164,70 (C-3a)	143,67 (C-4a)	129,22 (C-6)
127,17 (C-8)	125,06 (C-5)	123,68 (C-7)
120,64 (C-8a)	52,40 (C-9)	47,45 (C-1)
31,81 (C-3)	19,59 (C-2)	

IR (KBr), ν (cm^{-1}): 1624, 1592, 1577, 1496, 1466, 1458, 1302, 1234, 1182, 1125, 876, 750, 717, 560

MS (ESI, MeOH): $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2$ (172)
 ES^+ : 173 (100 $[\text{M}+\text{H}]^+$)

Massenfeinbestimmung (ESI-HR-MS):

berechnet: 173.107874 für $[\text{M}+\text{H}]^+$
gefunden: 173.108781

2.3. Alternative Synthesevorschriften für die Herstellung von Pegenon

2.3.1. Allgemeine Vorschrift bei Verwendung von anorganischen Salzen

63,0 g 2-Pyrrolidinon (5) (0,74 Mol) wurden auf 105°C erhitzt und unter Rühren 24,1 g Isatosäureanhydrid (4) (0,15 Mol) langsam eingestreut. Dann wurde das anorganische Salz in der jeweiligen Menge zugegeben und der Ansatz auf 155°C für 4 h erhitzt. Nach diesen 4 h wurde eine Probe für eine ^1H -NMR Messung entnommen und der Umsatz zum Pegenon (6) bezogen auf das Edukt Isatosäureanhydrid (4) in Prozent berechnet. Nebenprodukte wurden quantitativ erfasst und aufgeführt, aber deren Struktur nicht

aufgeklärt. Die Menge an anorganischem Salz wird in folgender Tabelle im molaren Verhältnis bezogen auf 1 Mol Edukt Isatosäureanhydrid (4) angegeben.

	Pegenon (<u>6</u>)	Isatosäureanhydrid (<u>4</u>)	Nebenprodukte
NH_4Cl $1/3$ Mol	83 %	8,5 %	8,5 %
NH_4Cl $1/12$ Mol	85 %	4 %	11 %
NH_4Cl $1/48$ Mol	85 %	7 %	8 %
CaCl_2 $1/3$ Mol	87 %	8 %	5 %
CaCl_2 $1/12$ Mol	93 %	2 %	5 %
CaCl_2 $1/48$ Mol	92 %	3 %	5 %
MgCl_2 $1/3$ Mol	87 %	6 %	7 %
MgCl_2 $1/12$ Mol	90 %	4 %	6 %
MgCl_2 $1/48$ Mol	88 %	4 %	8 %
CaSO_4 $1/3$ Mol	68 %	20 %	12 %
CaSO_4 $1/12$ Mol	65 %	22 %	13 %
CaSO_4 $1/48$ Mol	65 %	24 %	11 %
NaSO_4 $1/3$ Mol	68 %	22 %	10 %
NaSO_4 $1/12$ Mol	72 %	18 %	10 %
NaSO_4 $1/48$ Mol	73 %	15 %	12 %
MgSO_4 $1/3$ Mol	70 %	21 %	9 %

MgSO ₄ ¹ / ₁₂ Mol	73 %	17 %	10 %
MgSO ₄ ¹ / ₄₈ Mol	73 %	18 %	9 %
ZnSO ₄ ¹ / ₃ Mol	62 %	24 %	14 %
ZnSO ₄ ¹ / ₁₂ Mol	65 %	23 %	12 %
ZnSO ₄ ¹ / ₄₈ Mol	67 %	23 %	10 %

2.3.2. Allgemeine Vorschrift mit reduzierter Menge an 2-Pyrrolidinon (5)

5,1 l 2-Pyrrolidinon (5) (64,4 Mol) wurden auf 155°C erhitzt und unter Rühren innerhalb von 2 h 10 kg Isatosäureanhydrid (4) (61,3 Mol) langsam eingestreut. Dieser Ansatz reagierte für 4 h bei dieser Temperatur unter Rühren und wurde dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Es bildete sich ein einheitlich dunkelbrauner zusammenhängender Feststoff. Laut ¹H-NMR Messung bestand dieser Feststoff aus 80 % Pegenon (6) und 20 % Nebenprodukte.

200 g des feinpulverisierten Feststoffes wurden in 500 ml Ethylacetat in der Nähe des Siedepunktes bei 77°C gelöst und dann die nichtlöslichen Bestandteile durch Filtration vom dunkelbraunen Filtrat getrennt. Es wurden 130 ml 40 %-ige Schwefelsäure zum Filtrat gegeben und das Pegenonhydrogensulfat durch Zugabe von 1,2 l Aceton ausgefällt. Der hellbraune Niederschlag wurde mit Hilfe eines Unterdruckes abfiltriert und mit Aceton sorgfältig nachgewaschen. Das Pegenonhydrogensulfat wurde bei Raumtemperatur in 1,6 l demineralisiertem Wasser gelöst und nochmals filtriert. Das gelbe Filtrat wurde mit 10 M Natronlauge auf pH 11 eingestellt. Die alkalische Lösung wurde fünfmal mit jeweils 500 ml Ethylacetat ausgeschüttelt und die erhaltenen

organischen Phasen miteinander vereinigt. Nach Trocknen über Natriumsulfat und einem Filtrationsvorgang engte man die organische Phase bis zur Trockne am Rotavapor ein. Man erhielt 80 g hellgelbe Pegenon (6) Kristalle mit einer Reinheit von > 99,9 % (m/m). Das entsprach einer Ausbeute von 40 %. Die analytischen Daten von Pegenon (6) sind dem Kapitel 2.1., Experimenteller Teil, zu entnehmen.

2.4. Alternative Synthesevorschriften für die Herstellung von Desoxypeganin (3)

2.4.1. Allgemeine Vorschrift bei Verwendung von Schwefelsäure

175 g hellbraune Pegenon (6) Kristalle aus Kapitel 2.1., Experimenteller Teil, (150 g Pegenon (6) rein, 0,8 Mol) wurden in 550 ml Essigsäure (9,6 Mol) bei 50°C gelöst. Innerhalb von 1 h wurden 250 g Zinkstaub (3,8 Mol) langsam eingestreut und dann für eine Stunde bei 50°C gerührt. In den nächsten 2 h wurden zuerst 1060 ml 20 %-ige Schwefelsäure (2,55 Mol), dann 480 ml 40 %-ige Schwefelsäure in gleichmässigen Abständen zugegeben. Nach kompletter Säurezugabe wurde nach weiteren 2 h der Reaktionsansatz durch Filtration über Baumwollkoltücher vom überschüssigen Zinkpulver befreit. Dem sauren Filtrat wurden vorsichtig insgesamt 1,5 kg Natriumhydroxid-Plätzchen (37,5 Mol) zugegeben. Durch den stark exothermen Neutralisationsvorgang schmolz die Desoxypeganinbase (3) und rahmte als braune ölige Flüssigkeit auf. Nach Abkühlen und Erstarren wurde die Base im Ganzen abgehoben und bei Raumtemperatur für 1 Woche getrocknet. Die Auswaage betrug 120 g bei 97 %-iger Reinheit (m/m). Das entsprach 83 % Ausbeute bezogen auf die reine Base. Die weitere Aufarbeitung sowie die analytischen Daten von Desoxypeganin (3) sind dem Kapitel 2.2., Experimenteller Teil, zu entnehmen.

3. Bearbeitung des Desoxypeganin-Wasserstoffperoxid-Ansatzes

3.1. Arbeitsvorschrift zur Herstellung des Oxidationsansatzes

1,8 g Desoxypeganin (**3**) · ½ H₂O (9,46 mMol) aus Kapitel 2.2., Experimenteller Teil, wurden in 10 ml Essigsäure 99 - 100 % bei Raumtemperatur gelöst. Dann wurde über drei Tage insgesamt 2,2 ml 30 %-ige Wasserstoffperoxidlösung (21,5 mMol) in gleichmässigen Abständen zugetropft und verschlossen unter Lichtausschluss eine Woche lang aufbewahrt. Nach Abrotieren des Lösungsmittels und der überschüssigen Wasserstoffperoxidlösung unter vermindertem Druck bei 40°C wurde dieser Ansatz (1,7 g) für die weitere analytische und präparative Weiterbearbeitung verwendet.

3.2. Präparative Trennung der Hauptsubstanzen

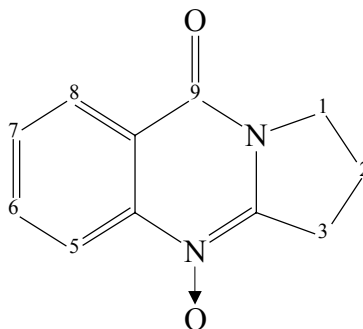
Nach Entwicklung einer geeigneten analytischen Methode mittels RP-Chromatographie (Methode **A1**, Kap. 1.1.2., Experimenteller Teil) konnte diese direkt in den präparativen Maßstab übernommen werden (Methode **P1**, Kap. 1.1.2., Experimenteller Teil).

Zu diesem Zweck wurden 1,6 g des einrotierten Ansatzes in 16 ml der mobilen Phase gelöst und viermal in Portionen von 4 ml pro Lauf präparativ getrennt. Die vereinigten Einzelfraktionen aus insgesamt 4 Läufen wurden unter vermindertem Druck bei 40°C zur Trockne eingedampft. Die drei Hauptfraktionen waren laut analytischer HPLC bereits reine Verbindungen und wurden im Weiteren strukturell aufgeklärt.

Fraktion	4	7	8
Auswaage [mg]	355	220	385

3.3. Präparativ getrennte Substanzen

Fraktion 4: Pegenon-N-Oxid (7)



2,3-Dihydro-4-oxo-pyrrolo[2,1-b]chinazolin-9-on (7)

Schmelzpunkt: 156°C, hellbraune Kristalle aus Aceton (Lit.[91]: 152-153°C)

UV: λ_{max} : 215, 304 nm (Wasser-Methanol = 60:40)

¹H-NMR (MeOH-d₄, 500 MHz), δ (ppm):

8,30 (d, 1 H, C-5-H)

8,24 (d, 1 H, C-8-H)

8,00 (t, 1 H, C-7-H)

7,70 (t, 1 H, C-6-H)

4,33 (t, 2 H, C-1-H)

3,51 (t, 2 H, C-3-H)

2,41 (m, 2 H, C-2-H)

^{13}C -NMR (MeOH- d_4 , 125 MHz), δ (ppm):

158,45 (C-3a)	155,19 (C-9)	143,78 (C-4a)
136,65 (C-7)	130,07 (C-6)	128,17 (C-8)
121,92 (C-8a)	118,86 (C-5)	50,74 (C-1)
30,61 (C-3)	19,79 (C-2)	

Die Zuordnung erfolgte hier anhand einer C,H-COSY-Messung.

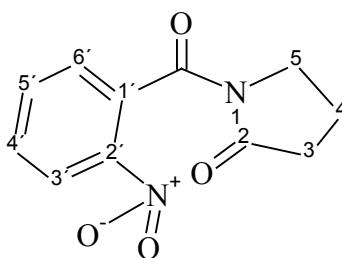
IR (KBr), ν (cm^{-1}): 1707, 1676, 1630, 1602, 1491, 1473, 1433, 1420, 1332, 1217,
1152, 1088, 1007, 900, 800, 770, 688, 634

MS (ESI, MeOH): $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ (202)
 ES^+ : 203 (100 $[\text{M}+\text{H}]^+$)

Massenfeinbestimmung (ESI-HR-MS):

berechnet: 203.082053 für $[\text{M}+\text{H}]^+$

gefunden: 203.080191

Fraktion 7: 1-(2'-Nitrobenzoyl)pyrrolidin-2-on (8)

Schmelzpunkt: 103°C, hellbraune Kristalle aus Aceton

UV: λ_{max} : 214, 266 nm (Wasser-Methanol = 60:40)

$^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4 , 500 MHz), δ (ppm):

8,23 (d, 1 H, C-6'-H)

7,79 (t, 1 H, C-4'-H)

7,66 (t, 1 H, C-5'-H)

7,44 (d, 1 H, C-3'-H)

4,00 (t, 2 H, C-3-H)

2,52 (t, 2 H, C-5-H)

2,13 (m, 2 H, C-4-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4 , 125 MHz), δ (ppm):

177,07 (C-2) 168,14 (C=O) 146,58 (C-2')

135,68 (C-5') 134,48 (C-1') 131,30 (C-4')

129,24 (C-6') 124,91 (C-3') 46,60 (C-5)

33,53 (C-3) 18,31 (C-4)

Die Zuordnung erfolgte anhand einer C,H-COSY-Messung.

IR (KBr), ν (cm^{-1}): 1745, 1685, 1630, 1560, 1518, 1465, 1346, 1325, 1310, 1020,
860, 792, 667, 546

MS (ESI, MeOH): $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$ (234)
 ES^+ : 235 (100 $[\text{M}+\text{H}]^+$)

Massenfeinbestimmung (ESI-HR-MS):

berechnet: 235.064059 für $[\text{M}+\text{H}]^+$

gefunden: 235.062053

Fraktion 8: Pegenon (6)

Die analytischen Daten sind dem Kapitel 2.1., Experimenteller Teil, zu entnehmen.

4. Oxidationsversuche mit Mikrowellen als Wärmequelle

4.1. Oxidation im sauren Milieu

0,9 g Desoxypeganin (3) · ½ H₂O (4,73 mMol) aus Kapitel 2.2., Experimenteller Teil, wurden in 5 ml Essigsäure 99 - 100 % bei Raumtemperatur gelöst und 1,0 ml 30 %-ige Wasserstoffperoxidlösung (9,78 mMol) zugegeben. Dieser Ansatz wurde dann der Mikrowellenstrahlung bei 850 Watt minutenweise ausgesetzt. Nach 5, 10, 15 und 30 Minuten wurden Proben für HPLC-Messungen entnommen und quantitativ ausgewertet (Methode A1). Dabei entstehende Nebenprodukte wurden quantitativ erfasst, aber nur die drei Hauptprodukte hier aufgeführt.

850 Watt	0 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.
Pegenon (<u>6</u>)	100 %	59,51 %	46,90 %	43,00 %	31,00 %
1-(2'-Nitrobenzoyl) pyrrolidin-2-on (<u>8</u>)	0 %	1,46 %	1,97 %	4,44 %	6,15 %
Pegenon-N-Oxid (<u>7</u>)	0 %	26,28 %	32,32 %	34,28 %	35,00 %

4.2. Oxidation im basischen Milieu

10 mg Desoxypeganin (3) · ½ H₂O (0,05 mMol) aus Kapitel 2.2., Experimenteller Teil, wurden in 0,6 ml Methanol-d₄ 99,8 % bei Raumtemperatur in einem NMR-Röhrchen gelöst, 2 mg Kaliumhydroxid und 0,05 ml 30 %-ige Wasserstoffperoxidlösung (0,49 mMol) zugegeben. Nach 12 Minuten in der Mikrowelle bei 425 Watt wurde eine ¹H-

NMR-Messung durchgeführt, das Ergebnis mit den analytischen Daten aus Kapitel 2.1., Experimenteller Teil, verglichen und quantitativ ausgewertet (Methode **A1**).

425 Watt	12 Min.
Pegenon (<u>6</u>)	62,00 %
1-(2'-Nitrobenzoyl) pyrrolidin-2-on (<u>8</u>)	1,2 %
Pegenon-N-Oxid (<u>7</u>)	34,50 %

5. Biotransformationsversuche mit 9000 g Überstand

5.1. Allgemeine Vorschrift zur Herstellung des 9000 g Überstandes

Alle Arbeitsschritte wurden bei 0-4°C durchgeführt. Die frisch entnommenen Kaninchenlebern (4 Stück) wurden sofort in 500 ml 1,15 %-ige Kaliumchloridlösung gegeben. Die Lebern wurden viermal mit 100 ml Phosphatpuffer pH 7,4 gewaschen, mit einem Baumwolltuch abgetrocknet und mit Hilfe eines Skalpells in kleine Stücke zerteilt. Die Lebern hatten ein Gesamtgewicht von 215 g und ein Volumen von 200 ml. Es wurden 2 Volumenteile (400 ml) 1,15 %-ige Kaliumchloridlösung zu den zerschnittenen Leberstücken gegeben und mit einem Ultra-Turrax fünfmal je 2 Minuten weiter zerkleinert. Diese rote Suspension wurde bei 2°C 30 Minuten bei 9000 g zentrifugiert und der 9000 g Überstand (500 ml) dekantiert.

5.2. In-vitro Inkubationsansätze

Die Inkubationsansätze enthielten 1,0 ml der Substratlösung (Desoxypeganin (3) Lösung 10 µmol/ml oder Pegenon (6) Lösung 10 µmol/ml), 3,0 ml Phosphatpuffer pH 7,4 (13 mM KH₂PO₄, 53 mM Na₂HPO₄ · 2 H₂O) oder Boraxpuffer pH 8,6 (30,4 mM H₃BO₃, 60,8 mM NaOH, 33,1 mMol HCl) und 1,0 ml Cofaktorlösung (2,0 mg NADPH, 0,2 ml MgCl₂-Lösung 0,1 M mit destilliertem Wasser auf einen Milliliter Endvolumen aufgefüllt). Nach 2 Minuten Präinkubation bei 37°C wurde dann 1,0 ml des 9000 g Überstandes den Ansätzen zugegeben, für 40 Minuten inkubiert und durch Abkühlen der Ansätze auf Eis die Inkubation beendet.

Ansatz Nr.	Substrat 10 µmol/ml	Puffer pH 7,4	Puffer pH 8,6	Cofaktor- lösung	P R Ä I N K U B A T I O N	9000g Überstand
1	Desoxypeganin (3)	x	—	x		x
2	Desoxypeganin (3)	—	x	x		x
3	Pegenon (6)	x	—	x		x
4	Pegenon (6)	—	x	x		x
5	Kein Substrat	x	—	x		x
6	Desoxypeganin (3)	x	—	—		x
7	Desoxypeganin (3)	x	—	x		—
8	Pegenon (6)	x	—	—		x
9	Pegenon (6)	x	—	x		—

Jedem Ansatz wurden 4,0 g Natriumchlorid und 3,0 ml Diethylether zugegeben und für 30 Minuten ausgeschüttelt. Die Etherphase wurde entnommen und unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingedampft. Diese Proben wurden in 0,5 ml Wasser-Acetonitril (9:1, v/v) gelöst und mit Methode A2 per HPLC-MS vermessen.

5.3. Erstellung einer Eichgeraden und Bestimmung der Wiederfindungsrate

Eichgerade mit dem Hauptmetaboliten Pegenon (6)

1, 2,5, 5, 10, 25, 50 µmol/ml Pegenon (6) mit HPLC Methode A2 vermessen und die AUC bestimmt.

Geradengleichung der Kalibriergeraden A:

$$y = 1,243 \cdot 10^6 x + 215247 \text{ (Korrelationskoeffizient } r^2 = 0,9999)$$

Wiederfindungsrate mit dem Hauptmetaboliten Pegenon (6)

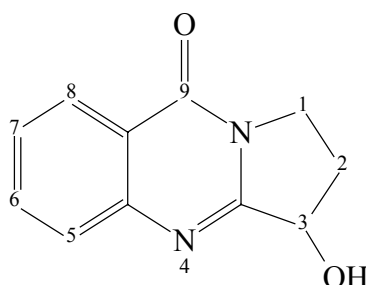
1, 2.5, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{mol/ml}$ Pegenon (6) als Substratkonzentration und weitere Inkubation (hier aber bei 0°C) wie in Kapitel 5.2., Ansatz Nr. 3, Experimenteller Teil, beschrieben.

Geradengleichung der Kalibriergeraden B:

$$y = 1,003 \cdot 10^6 x - 37344 \text{ (Korrelationskoeffizient } r^2 = 0,9980)$$

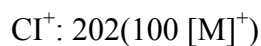
Quotient der Steigungen der Kalibriergeraden A und B:

$$y = 1,003 \cdot 10^6 / 1,243 \cdot 10^6 = 80,7 \% \text{ Wiederfindungsrate}$$

5.4. Hauptmetabolite**Bruttoretentionszeit $t_R = 19,3 \text{ min}$: Vasicinon (2)****2,3-Dihydro-3-hydroxy-pyrrolo[2,1-b]chinazolin-9-on (2)**

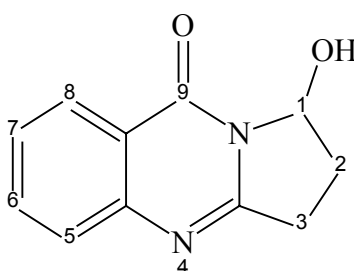
UV: λ_{max} : 205, 226, 271, 302 nm (Wasser-Acetonitril = 72:28)

MS (Cl^+ , Wasser-Acetonitril = 72:28):



MS (EI, Wasser-Acetonitril = 72:28): 202 (100 [M]⁺), 146(80), 119 (35), 185 (20), 186 (18), 147 (14), 145 (13), 90 (13), 130 (12), 118 (11), 203 (11), 102 (10), 129 (9), 76 (9), 171 (8), 103 (8), 201 (7), 54 (7), 174 (6), 92 (5), 63 (5)

Bruttoretentionszeit t_R = 21,5 min: Isovasicinon (9)



2,3-Dihydro-1-hydroxy-pyrrolo[2,1-b]chinazolin-9-on (9)

UV: λ_{max} : 203, 226, 264, 304 nm (Wasser-Acetonitril = 67:33)

MS (CI⁺, Wasser-Acetonitril = 67:33):

C₁₁H₁₀N₂O₂ (202)

CI⁺: 202(100 [M]⁺)

MS (EI, Wasser-Acetonitril = 67:33): 202 (77 [M]⁺), 173 (100), 174 (34), 185 (31), 186 (22), 201 (20), 119 (19), 116 (17), 146 (11), 92 (10), 90 (10), 54 (9), 203 (8), 184 (7), 63 (7), 171 (6), 130 (6), 77 (6), 76 (6), 102 (5), 64 (5)

Bruttoretentionszeit t_R = 26 min: Pegenon (6)

Die analytischen Daten sind dem Kapitel 2.1., Experimenteller Teil, zu entnehmen.

5.5. Enzymkinetische Betrachtungen

5.5.1. Proteinbestimmung nach Biuret

Eichgerade mit einem Proteinstandard

Der Proteinstandard enthält 2,0 mg/ml Rinderserumalbumin (**B**ovine-**S**erum-**A**lbumin, **BSA**). Das Endvolumen in der Küvette soll 2,5 ml betragen. Nach Vortexen der Ansätze 1-6 wurden jeweils 2,5 ml Biuret-Reagenz zugegeben, nochmals gemischt und nach 30 Minuten bei 546 nm die Absorption bestimmt.

Ansatz Nr.	1	2	3	4	5	6
Wasser [ml]	2,5	2,0	1,5	1,0	0,5	0
BSA-Standard [ml]	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Proteingehalt [mg]	0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
Absorption	0	0,046	0,084	0,129	0,167	0,219

Geradengleichung der Eichgeraden:

$$y = 0,0429x + 0,0001 \text{ (Korrelationskoeffizient } r^2 = 0,9983)$$

Bestimmung der Proteinkonzentration im 9000 g Überstand

Der 9000 g Überstand aus Kapitel 5.1., Experimenteller Teil, wurde mit demineralisiertem Wasser 1:17 (v/v) verdünnt. Dann wurde 20 %-ige Trichloressigsäure (TCA) zugegeben, bei 2000 g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgegossen und den Rückstand in 2,5 ml demineralisiertem Wasser wieder gelöst.

Nach Zugabe von 2,5 ml Biuret-Reagenz wurde nach 30 Minuten bei 546 nm die Absorption bestimmt und aus der Absorption über die Gleichung der Eichgeraden die Proteinkonzentration berechnet.

Ansatz Nr.	7	8	9	10
9000 g Verdünnung [ml]	0,5	1,0	1,0	1,5
TCA-Menge [ml]	1,0	2,0	2,0	3,0
Zentrifugation				
Wasser [ml]	2,5	2,5	2,5	2,5
Absorption	0,07	0,152	0,147	0,218
Berechnete Proteinkonzentration [mg]	1,63	3,54	3,42	5,08

Unter Einbeziehen der eingesetzten Menge an 9000 g Verdünnung sowie der Verdünnung 1:17 (v/v) erhält man eine Konzentration von 56,77 mg Protein pro ml 9000 g Überstand (1 T Leber + 2 Puffer).

5.5.2. Gehaltsbestimmung von Cytochrom P450

Der 9000 g Überstand aus Kapitel 5.1., Experimenteller Teil, wurde mit Trispuffer (603 mg/ 100 ml H₂O) - Glycerin (5:1, v/v) auf eine Konzentration von 1,5 mg/ml Protein verdünnt und mit Salzsäure auf pH 7,0 eingestellt. 30 mg Natriumdithionit wurde in 3,0 ml dieser Verdünnung gegeben und nach 2 Minuten ein Leerwertspektrum von 390 - 500 nm aufgenommen. Dann wurde durch diese Probe Kohlenmonoxid (konzentrierte Schwefelsäure plus konzentrierte Ameisensäure) für 30 Sekunden geleitet und das Differenzspektrum aufgenommen. Die Differenz beider Spektren im Absorptionsmaximum bei 450 nm, dividiert durch den Extinktionskoeffizienten des Enzyms von 91 cm⁻¹ · mM⁻¹ [137] ergibt einen Cytochrom P450-Gehalt von 1,28 nmol pro mg Protein.

5.5.3. Michaelis-Menten Kinetik und Lineweaver-Burk Linearisierung

Der 9000 g Überstand aus Kapitel 5.1., Experimenteller Teil, wurde 1:10 (v/v) mit demineralisiertem Wasser verdünnt. Es wurde eine Cofaktorrösung (0,4 ml MgCl₂ 0,1 M und 4,0 mg NADPH wurden mit destilliertem Wasser auf 10,0 ml Endvolumen aufgefüllt) hergestellt. Zusätzlich benötigte man Phosphatpuffer pH 7,4 (Kapitel 5.2., Experimenteller Teil) und eine Verdünnungsreihe von Desoxyperanin (3) (0.5, 0.2, 0.1, 1, 2, 10 µmol/ml). Nach dem Zusammenfügen der einzelnen Komponenten wurde in

einer 37°C beheizten Küvette (3 ml Probevolumen) die UV-Absorption bei 340 nm zeitabhängig bestimmt und die Reaktionsgeschwindigkeit (Minute 5 - 15) berechnet.

Berechnung der enzymkinetischen Daten

1. $K_M^{-1} = -17,11 \rightarrow K_M = 0,0584454 \mu\text{mol}/\text{ml} = 5,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$
2. $V_{\max}^{-1} = 81,57 \rightarrow V_{\max} = 0,012259 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ 9000 g Verdünnung = 12,26 nmol/ min/ 2,84 mg Protein = 4,32 nmol/ min/ mg Protein
3. Bei einem Cytochrom P450-Gehalt von 1,28 nmol pro mg Protein errechnet sich ein Wert von 3,37 nmol/ min/ nmol CYP 450

Ansatz Nr.	1	2	3	4	5	6
0,5 ml Desoxypeganin (3)- Lösung	0,1 $\mu\text{mol}/\text{ml}$	0,2 $\mu\text{mol}/\text{ml}$	0,5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$	1 $\mu\text{mol}/\text{ml}$	2 $\mu\text{mol}/\text{ml}$	10 $\mu\text{mol}/\text{ml}$
Cofaktor- Lösung [ml]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Phosphatpuffer pH 7,4 [ml]	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
9000 g Verdünnung [ml]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Substratkonzentration [μmol/ 3 ml]	0,0167	0,0333	0,0833	0,1667	0,3330	1,6666
Reziproke Substratkonzentration	59,88	30,03	12,00	6,00	3,00	0,60
Reziproke Reaktions- geschwindigkeit	364,74	230,10	132,35	115,17	102,33	75,51

5.6. Inkubationsversuche mit S9 Mix (menschliche Leber)

Die Inkubationsansätze enthielten 0,5 ml der Substratlösung (Desoxypeganin (3) Lösung 10 μmol/ml Phosphatpuffer pH 7,4 (Kap. 5.2., Experimenteller Teil) und 0,25 ml Cofaktorklösung (40,0 mg NADPH, 1,0 ml MgCl₂-Lösung 0,1 M, 4,0 ml destilliertes Wasser). Die jeweiligen Substrate oder Inhibitoren wurden in doppelt äquimolarer Menge eingesetzt. Nach 2 Minuten Präinkubation bei 37°C wurden dann jeweils 50 μl des S9 Mix (menschliche Leber, Firma Natutec, Best. Nr. 452961, Charge s13/28/37/39/56) den Ansätzen zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Dann wurde in jeden Ansatz 500 μl Acetonitril pipettiert und bei 13000 g 20 Minuten zentrifugiert. Die Überstände konnten direkt als Probe für die HPLC-Messungen eingesetzt werden (Methode **A2**).

Für die quantitative Auswertung über die AUC von Desoxypeganin (3) und Pegenon (6) wurde 1,0 mg der jeweiligen Substanz in 1,0 ml Ausgangsbedingungen der mobilen Phase gelöst, 20 μl in die HPLC eingespritzt, die AUC berechnet und das Verhältnis dieser durch Division bestimmt (Desoxypeganin (3) : Pegenon (6) / 1 : 2,12).

Ansatz Nr.	Wirkstoff	Inhibitor/Substrat	Einwaage
2	Theophyllin	1A2-Substrat	1,86 mg
3	α -Naphtoflavon	1A2-Inhibitor	2,72 mg
4	Metoprolol	2D6-Substrat	2,67 mg
5	Chinidin	2D6-Inhibitor	3,24 mg
6	Nimodipin	3A4-Substrat	3,90 mg
7	Ketoconazol	3A4-Inhibitor	5,35 mg

6. Desoxypeganin- Salze

6.1. Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von Desoxypeganin-Salzen mit Ethanol

20,0 g Desoxypeganin (3) Base (0,116 Mol) aus Kapitel 2.2., Experimenteller Teil, wurden unter Rühren in 150 ml Ethanol gelöst und der Ansatz auf 4°C gekühlt. Die jeweilige Säure wurde langsam zugetropft und das ausgefällte Salz über einen 3 µm Glasfaserfilter mit Anlegen eines Überdruckes abfiltriert. Bei 70°C wurden die Salze über Nacht im Trockenschrank getrocknet.

Die Salze aus den Säuren 4-Brombenzoesäure, Salicylsäure, Acetylsalicylsäure, Benzoessäure und Nikotinsäure (Kap. 10.6., Theoretischer Teil) wurden mit dieser Vorschrift hergestellt.

Desoxypeganin-Salz	Säurekomponente	Menge Säure
Hydrochlorid	Salzsäure 32%	14,0 g (0,128 Mol)
Hydrogensulfat	Schwefelsäure 40%	31,4 g (0,128 Mol)
Hydrobromid	Bromwasserstoffsäure 48%	21,6 g (0,128 Mol)
Dihydrogenphosphat	ortho-Phosphorsäure 60%	14,8 g ortho-Phosphorsäure 85% in 6,24 g H ₂ O lösen (0,128 Mol)
Hydrogenmaleat	Maleinsäure	12,55 g Maleinsäureanhydrid in 15,7 g H ₂ O lösen (0,128 Mol)
Citrat	Citronensäure	24,63 g in 18,5 g H ₂ O lösen (0,128 Mol)

Mesilat	Methansulfonsäure 60 %	12,3 g Methansulfonsäure 98% in 8,2 g H ₂ O lösen (0,128 Mol)
Tartrat	L(+)-Weinsäure	9,6 g in 7,5 g H ₂ O lösen (0,064 Mol)

6.2. Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von Desoxypeganin-Salzen mit Aceton

20,0 g Desoxypeganin (3) Base (0,116 Mol) aus Kapitel 2.2., Experimenteller Teil, wurden unter Rühren in 150 ml heissem Aceton gelöst und warm durch ein vorgewärmtes Filtrationsgerät mit 0,7 µm Glasfaserfilter mit 3 µm Glasfaser Vorfilter filtriert. Diese Lösung wurde auf 50°C erwärmt und die jeweilige Säure unter Rühren zugetropft. Nach dem Erkalten auf Raumtemperatur wurde das ausgefällte Salz über einen 3 µm Glasfaserfilter unter Anlegen eines Überdruckes abfiltriert. Man trocknete die Salze über Nacht bei 70°C im Trockenschrank.

Desoxypeganin-Salz	Säurekomponente	Menge Säure	Ausbeute
Hydrochlorid I	Salzsäure 32%	14,0 g (0,128 Mol)	95%
Hydrochlorid II	Salzsäure 32%	14,0 g (0,128 Mol)	91%
Hydrobromid	Bromwasserstoffsäure 48%	21,6 g (0,128 g)	81%

6.3. Kernresonanzmessung der protonierten Desoxypeganin-Base

20,0 mg Desoxypeganinbase (3) aus Kapitel 2.2., Experimenteller Teil, wurden in 0,6 ml Nitromethan-d₃ gelöst und eine ¹H-NMR Messung sowie eine ¹³C-NMR Messung durchgeführt. Zusätzlich wurde eine weitere Probe mit 20,0 mg Desoxypeganinbase (3) aus Kapitel 2.2., Experimenteller Teil, in 0,6 ml Nitromethan-d₃ gelöst, 15,0 mg Trifluoressigsäure 99,9% zugegeben und eine ¹H-NMR Messung sowie eine ¹³C-NMR Messung durchgeführt. Die Verschiebungen wurden miteinander verglichen und zeigen die Unterschiede der Desoxypeganinbase (3) und der protonierten Base (Desoxypeganinsalz).

¹H-NMR (Nitromethan-d₃, 500 MHz), δ (ppm):

Desoxypeganin (<u>3</u>) Base	protonierte Desoxypeganin (<u>3</u>) Base
7,10 (t, 1 H, C-6-H)	7,32 (t, 1 H, C-6-H)
6,92 (m, 2 H, C-7/8-H)	7,25 (t, 1 H, C-7-H)
	7,22 (d, 1 H, C-8-H)
6,88 (d, 1 H, C-5-H)	7,17 (d, 1 H, C-5-H)
4,52 (s, 2 H, C-9-H)	4,80 (s, 1 H, C-9-H)
3,44 (t, 2 H, C-1-H)	3,80 (t, 2 H, C-1-H)
2,51 (t, 2 H, C-3-H)	3,11 (t, 2 H, C-3-H)
2,02 (m, 2 H, C-2-H)	2,33 (m, 2 H, C-2-H)

¹³C-NMR (Nitromethan-d₃, 125 MHz), δ (ppm):

Desoxypeganin (<u>3</u>) Base	protonierte Desoxypeganin (<u>3</u>) Base
164,76 (C-3a)	164,76 (C-3a)
145,36 (C-4a)	132,86 (C-4a)
129,32 (C-6)	130,52 (C-6)
127,37 (C-8)	118,55 (C-8)
124,69 (C-5)	128,31 (C-5)
124,64 (C-7)	128,15 (C-7)
121,55 (C-8a)	118,25 (C-8a)
52,45 (C-9)	55,09 (C-9)
47,73 (C-1)	47,32 (C-1)
32,00 (C-3)	31,17 (C-3)
19,91 (C-2)	19,50 (C-2)

7. Desoxypeganin-Tabletten

7.1. Allgemeine Vorschrift zur Direkttablettierung von Desoxypeganin-Salzen

Tablettenrezeptur:

- 20,0 g Desoxypeganinsalz aus Kapitel 6.1. und 6.2., Experimenteller Teil
- 12,0 g Tablettose[®] 80
- 0,32 g Aerosil[®]
- 0,32 g Magnesiumstearat

Nach Homogenisieren der Bestandteile wurden die Rezepturen jeweils verpresst.

8. Transdermale Therapeutische Systeme

8.1. Herkunft und Präparation des eingesetzten Hautmaterials

Bei der verwendeten Humanhaut handelte es sich um exzidierte Vollhautstücke, die nach kosmetisch chirurgischen Eingriffen von einer Fachklinik als tiefgefrorene Hautstücke anonym zur Verfügung gestellt wurden. Im angetauten Zustand wurde das Unterhautfettgewebe bis auf die weisse Dermis weggeschabt. Die benötigten Hautstücke wurden mit einem Henkel-Locheisen aus den Hautpartien ausgeschlagen. Alter, Geschlecht, Körperregion und ethnische Zugehörigkeit waren bekannt.

8.2. Allgemeine Vorschrift zur Herstellung eines TTS mit Polyacrylaten

Für unsere Versuche wurden Ansätze mit einem Gesamtgewicht von 50-60 g hergestellt. Dabei löste man, je nach Wirkstoffgehalt der Formulierung, unterschiedliche Mengen an Desoxypeganinbase (3) aus Kapitel 2.2., Experimenteller Teil, in der jeweiligen Polyacrylat-Matrix und tropfte den Enhancer zu. Dieser Ansatz wurde für 2 Stunden gerührt und dann bis zur vollständigen Entfernung der Luftblasen ohne Rühren stehen gelassen. Mit einem Rakel (Einstellung 300 μm) wurde die Matrix auf den Release liner aufgetragen. Im Trockenschrank wurde die Matrix 20 Minuten bei 60°C getrocknet. Der letzte Arbeitsschritt beinhaltete das Kaschieren mit dem transparenten Backing layer. Das Pflaster wurde mit einem Henkel-Locheisen ausgestanzt (1,539 cm^2), das Gewicht bestimmt und die Wirkstoffmenge pro TTS berechnet.

8.3. Allgemeine Vorschrift zur Herstellung eines TTS mit Abitol/Hercures®

Pos.	Eingesetztes Material	Einwaage [g]	%
1	Ethylacetat	18,75	
2	Benzin	3,75	
3	Ethanol	3,75	
4	Isopropylmyristat	1,5	5,06
5	Hercures®	3,75	12,66
6	Abitol®	12,75	4,03
7	Desoxypeganinbase	3,0	10,13
8	Laurinsäure	3,0	10,13
9	Ethylcellulose	5,625	18,99

Position 1-4 wurde vorgelegt und Position 5-9 nacheinander unter Rühren zugegeben. Die Positionen 1-3 wurden im Trockenschrank abgedampft und wie in Kapitel 8.2., Experimenteller Teil, weiterverfahren.

8.4. Allgemeine Vorschrift für die Olivenöl-Formulierungen

Die 2 %-ige Wirkstoff-Olivenöl-Formulierung wurde durch einfache Zugabe von Desoxypeganinbase (3) aus Kapitel 2.2., Experimenteller Teil, bzw. Base-Äquivalente (Salze) sowie von den Dihydrochinazolin/ Chinazolinonen aus Kapitel 9., Experimenteller Teil, in Olivenöl hergestellt. Von dieser Lösung wurden 50 +/- 2 mg auf jeden Hautstanzling aufgetragen und okklusiv abgedeckt.

8.5. Durchführung der Permeationsmessung

Die ausgestanzten TTS wurden nach Abziehen des Release liners auf die Oberflächen der humanen Vollhaut aufgebracht und mit einem 250 g Gewicht 5 Minuten lang beschwert, um eine ausreichende Haftung während der Versuchsdauer zu gewährleisten. Dann wurde der TTS-Haut-Verbund zwischen Ober- und Unterteil der Diffusionszelle eingespannt und die Akzeptorkammer über den Probearm mit 9 ml 0,9 %-iger Kochsalzlösung (mit 0,1 % NaN₃ als Bakteriostatikum) befüllt. Die Diffusionszellen wurden in ein Wasserbad Typ BA 9 der Firma IKA mit selbstgebauter Zellenhalterung (Locheinsatz), Temperaturregelung (Umwälzthermostat Typ Julabo MP der Firma Julabo Labortechnik) und Rührmöglichkeit eingesetzt. Mit dem Beginn des Rührvorganges (650 U/min) erfolgte der Start des Permeationsversuches. Nach vorher festgelegten Zeitintervallen wurde das Akzeptormedium komplett ausgetauscht und durch frisches Medium ersetzt. Die entnommenen Proben wurden über Millex[®] HV-Filter der Firma Millipore filtriert und direkt in das verwendete HPLC-System injiziert. Die Permeationsversuche wurden alle als Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Permeation der Olivenöl-Formulierungen erfolgte durch Einspannen des abgedeckten Hautstanzlings von Kapitel 8.4., Experimenteller Teil, zwischen Ober- und Unterteil der Diffusionszelle. Die weiteren Arbeitsschritte sind analog der TTS-Versuchsreihe durchgeführt worden.

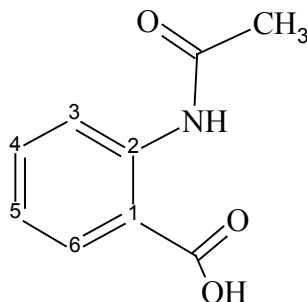
8.6. Permeationsergebnisse der Dihydrochinazoline und Chinazolinone

	Kumulierte Werte in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 8 h, n=3	Kumulierte Werte in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 24 h, n=3	Kumulierte Werte in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 32 h, n=3	Kumulierte Werte in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 48 h, n=3
Huminal (<u>11</u>)	0,9	3,8	6,2	12,9
Methaqualon (<u>10</u>)	2,6	14,2	28,0	51,5

	Kumulierte Werte in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 8 h, n=3	Kumulierte Werte in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 24 h, n=3	Kumulierte Werte in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 32 h, n=3	Kumulierte Werte in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 48 h, n=3
2-Methyl-3- phenyl-3,4- dihydrochinazolin (<u>13</u>)	0,3	1,1	2,4	7,0
2-Methyl-3- phenyl- chinazolin-4-on (<u>12</u>)	2,6	22,7	40,3	74,9

9. Synthese der Dihydrochinazoline und Chinazolinone

9.1. N-Acetylanthranilsäure (14), Methaqualon (10) und Huminal (11)



N-Acetylanthranilsäure (14)

100,0 g Anthranilsäure (0,73 Mol) wurden in 220 ml Essigsäureanhydrid (2,2 Mol) bei 40°C unter Rühren gelöst. Dieser Ansatz wurde für 4 h unter Rückfluss gekocht, unter Rühren auf Raumtemperatur abgekühlt und in 1 l Eiswasser eingegossen. Der entstehende gelbe Feststoff wurde abfiltriert und bei 60°C 12 h getrocknet [166].

Ausbeute: 118,0 g N-Acetylanthranilsäure (14) (90%)

Schmelzpunkt: 178-182°C, gelber Feststoff

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz), δ (ppm):

11,03 (br, 1 H, -OH)

8,45 (d, 1 H, C-6-H)

7,96 (d, 1 H, C-3-H)

7,57 (t, 1 H, C-5-H)

7,11 (t, 1 H, C-4-H)

3,70 (br, 1 H, -NH-)

2,09 (s, 3 H, -CO-CH₃)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz), δ (ppm):

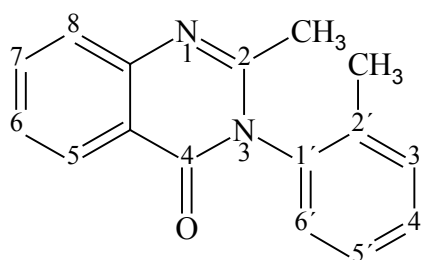
169,37 (-COOH)	168,35 (-CO-CH ₃)
140,79 (C-2)	133,86 (C-6)
130,96 (C-4)	122,45 (C-5)
119,89 (C-3)	116,46 (C-1)
24,90 (-CO-CH ₃)	

IR (KBr), ν (cm⁻¹): 3450, 3312, 1700, 1696, 1685, 1654, 1650, 1635, 1608, 1584, 1577, 1540, 1452, 1297, 1227, 1164, 1087, 962, 788, 765, 647, 551, 521, 428

MS (ESI, MeOH): C₉H₉NO₃ (179)
ES⁺: 180 (100 [M+H]⁺)

Massenfeinbestimmung (ESI-HR-MS):

berechnet: 180.066068 für [M+H]⁺
gefunden: 180.062086

Methaqualon (10) / 2-Methyl-3-o-tolyl-chinazolin-4-on (10)

70,0 g N-Acetylanthransäure (14) (0,4 Mol), 51,0 ml o-Toluidin (0,48 Mol) und 800 ml Toluol wurden zusammengegeben und mechanisch gerührt. Vorsichtig wurden 67,5 g POCl₃ (0,44 Mol) bei Raumtemperatur zugetropft und dann für 3 h unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen des Ansatzes auf 4°C wurde der entstandene hellgelbe Feststoff abfiltriert und bei 50°C über Nacht getrocknet. Der getrocknete Feststoff wurde in 600 ml demineralisiertem Wasser suspendiert und mit gesättigter NaHCO₃-Lösung neutralisiert (600 ml). Dieser Ansatz wurde dreimal mit je 300 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Calciumchlorid getrocknet, filtriert und zur Trockne eingengt. Das hellbraune Öl kristallisierte innerhalb 6 h und konnte aus Isopropanol umkristallisiert werden [167-170].

Ausbeute: 50,2 g Methaqualon (10) (50%)

Schmelzpunkt: 116°C, gelbes Pulver (Lit.[168,170]: 114-117°C)

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz), δ (ppm):

8,13 (d, 1 H, C-5-H)

7,84 (t, 1 H, C-7-H)

7,68 (d, 1 H, C-8-H)

7,51 (t, 1 H, C-6-H)

7,44 (t, 1 H, C-5'-H)

7,42 (d, 1 H, C-6'-H)

7,38 (d, 1 H, C-3'-H)

7,37 (t, 1 H, C-4'-H)

2,07 (s, 3 H, -CH₃ an C-2)

2,03 (s, 3 H, -CH₃ an C-2')

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz), δ (ppm):

160,63 (C-4) 154,19 (C-2)

147,35 (C-8a) 136,76 (C-1')

134,97 (C-2') 134,59 (C-7)

130,97 (C-3') 129,20 (C-6')

128,33 (C-4') 127,30 (C-5')

126,66 (C-5) 126,44 (C-6/8)

120,25 (C-4a) 23,4 (C an C-2)

16,75 (C an C-2')

Die Zuordnung erfolgte anhand Lit. [171].

IR (KBr), ν (cm⁻¹): 1654, 1644, 1608, 1599, 1567, 1560, 1488, 1468, 1459, 1433,
1354, 1340, 1337, 1327, 1279, 1270, 1228, 1152, 1124, 1101,
1019, 1002, 778, 761, 721, 704, 658, 625

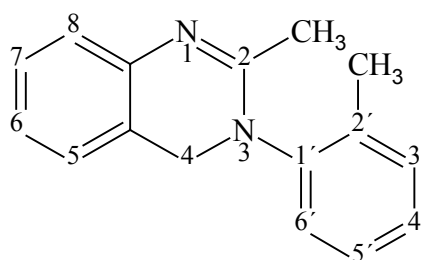
MS (ESI, MeOH): C₁₆H₁₄N₂O (250)

ES⁺: 251 (100 [M+H]⁺)

Massenfeinbestimmung (ESI-HR-MS):

berechnet: 251.118438 für [M+H]⁺

gefunden: 251.116976



Huminal (11) / 2-Methyl-3-o-tolyl-3,4-dihydrochinazolin (11)

12,5 g Methaqualon (10) (0,05 Mol) wurden in 100 ml Essigsäure 99 – 100 % bei 50°C gelöst. 24 g Zinkpulver (0,36 Mol) wurden zugegeben und für 1 h gerührt. Dann erfolgte innerhalb von 1 h die Zugabe von 120 ml konzentrierter Salzsäure (1,1 Mol). Nach 3 h bei 60°C wurde das überschüssige Zink abfiltriert, das Filtrat mit 200 ml 10 M Natronlauge (2 Mol) alkalisiert und dreimal mit je 100 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Calciumchlorid getrocknet, filtriert, bis zur Trockne eingengt und der Rückstand aus Isopropanol umkristallisiert.

Ausbeute: 2,65 g Huminal (11) (20%)

Schmelzpunkt: 143°C, gelbes Pulver

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz), δ (ppm):

7,55 (m, 3 H, C-3'/5'/6'-H)

7,48 (t, 1 H, C-4'-H)

7,30 (t, 1 H, C-6-H)

7,20 (m, 2 H, C-5/7-H)

7,15 (d, 1 H, C-8-H)

5,05 (s, 2 H, C-4-H)

2,05 (s, 3 H, -CH₃ an C-2)

2,02 (s, 3 H, -CH₃ an C-2')

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz), δ (ppm):

159,35 (C-2)	140,30 (C-8a)
134,55 (C-2')	131,25 (C-1')
131,10 (C-3')	130,95 (C-6')
129,70 (C-4')	128,80 (C-5')
128,60 (C-7)	128,20 (C-8)
126,60 (C-5)	117,95 (C-4a)
116,30 (C-6)	52,20 (C-4)
19,20 (C an C-2)	16,80 (C an C-2')

IR (KBr), ν (cm^{-1}): 1638, 1600, 1580, 1573, 1570, 1556, 1540, 1528, 1507, 1480,
1457, 1437, 1425, 1387, 1358, 850, 760, 680

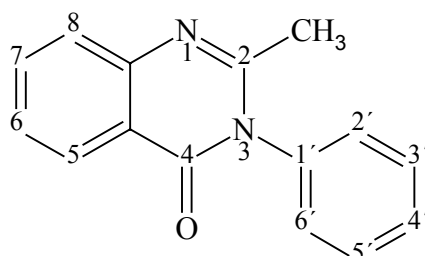
MS (ESI, MeOH): $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2$ (236)
 ES^+ : 237 (100 $[\text{M}+\text{H}]^+$)

Massenfeinbestimmung (ESI-HR-MS):

berechnet: 237.316523 für $[\text{M}+\text{H}]^+$

gefunden: 237.311458

9.2. 2-Methyl-3-phenyl-chinazolin-4-on (12) und 2-Methyl-3-phenyl-3,4-dihydrochinazolin (13)



2-Methyl-3-phenyl-chinazolin-4-on (12)

2-Methyl-3-phenyl-chinazolin-4-on (12) wurde analog der Vorschrift Methaqualon (10), Kapitel 9.1., Experimenteller Teil, hergestellt. Anstatt o-Toluidin wurden 45,0 ml Anilin (0,48 Mol) eingesetzt.

Ausbeute: 50,0 g 2-Methyl-3-phenyl-chinazolin-4-on (12) (53%)

Schmelzpunkt: 147°C, hellgelbes Pulver (Lit.[168]: 145-147°C)

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz), δ (ppm):

8,09 (d, 1 H, C-5-H)

7,82 (t, 1 H, C-7-H)

7,68 (d, 1 H, C-8-H)

7,56 (t, 1 H, C-6-H)

7,55 (t, 1 H, C-4'-H)

7,51 (m, 2 H, C-3'/5'-H)

7,43 (d, 2 H, C-2'/6'-H)

2,07 (s, 3 H, -CH₃ an C-2)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz), δ (ppm):

161,22 (C-4)	154,29 (C-2)
147,27 (C-8a)	136,81 (C-1')
134,46 (C-7)	129,47 (C-2'/6')
128,85 (C-4')	128,34 (C-3'/5')
126,57 (C-5)	126,30 (C-6/8)
120,42 (C-4a)	23,4 (C an C-2)

Die Zuordnung erfolgte anhand Lit. [171].

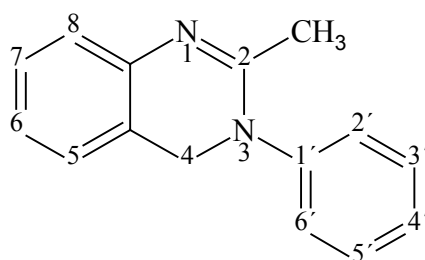
IR (KBr), ν (cm^{-1}): 1696, 1676, 1608, 1586, 1573, 1560, 1490, 1472, 1466, 1450,
1427, 1386, 1331, 1318, 1268, 1118, 1021, 770, 762

MS (ESI, MeOH): $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$ (236)
 ES^+ : 237 (100 $[\text{M}+\text{H}]^+$)

Massenfeinbestimmung (ESI-HR-MS):

berechnet: 237.102788 für $[\text{M}+\text{H}]^+$

gefunden: 237.106247

2-Methyl-3-phenyl-3,4-dihydrochinazolin (13)

2-Methyl-3-phenyl-3,4-dihydrochinazolin (13) wurde analog der Vorschrift Huminal (11), Kapitel 9.1., Experimenteller Teil, synthetisiert mit 11,8 g 2-Methyl-3-phenyl-chinazolin-4-on (12) (0,05 Mol) als Edukt.

Ausbeute: 1,9 g 2-Methyl-3-phenyl-3,4-dihydrochinazolin (17) (15%)

Schmelzpunkt: 150-153°C, hellgelbes Pulver

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz), δ (ppm):

7,62 (m, 4 H, C-2'/3'/5'/6')

7,52 (t, 1 H, C-4'-H)

7,35 (t, 1 H, C-6-H)

7,23 (t, 1 H, C-7-H)

7,22 (d, 1 H, C-5-H)

7,18 (d, 1 H, C-8-H)

5,07 (s, 2 H, C-4-H)

2,10 (s, 3 H, -CH₃ an C-2)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz), δ (ppm):

159,47 (C-2)	140,58 (C-8a)
131,29 (C-1')	130,21 (C-3'/5')
129,44 (C-4')	128,85 (C-7)
126,54 (C-5)	128,18 (C-2'/6'/8)
118,59 (C-4a)	116,84 (C-6)
52,38 (C-4)	19,14 (C an C-2)

IR (KBr), ν (cm^{-1}): 1654, 1638, 1624, 1577, 1573, 1570, 1566, 1560, 1554, 1507,
1499, 1496, 1476, 1457, 1437, 1419, 1387, 762, 697

MS (ESI, MeOH): $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2$ (222)
 ES^+ : 223 (100 $[\text{M}+\text{H}]^+$)

Massenfeinbestimmung (ESI-HR-MS):

berechnet: 223.123524 für $[\text{M}+\text{H}]^+$

gefunden: 223.121707

Literatur- und Quellenverzeichnis

- [1] Suchtkrankenhilfe Blaues Kreuz *<http://www.blaues-kreuz.de/bkd/sucht/sucht.htm>*
- [2] West, R. and Shiffman, S.: Effect of oral nicotine dosing forms on cigarette withdrawal symptoms and craving: a systematic review, *Psychopharmacology* 155, 115 – 122 (2001)
- [3] Mason, B. J.: Acamprosate and naltrexone treatment for alcohol dependence: an evidence-based risk-benefits assessment, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 13, 469 – 475 (2003)
- [4] Overman, G. P., Teter, C. J. and Guthrie, S. K.: Acamprosate for the adjunctive treatment of alcohol dependence, *Ann. Pharmacother.* 37, 1090 – 1099 (2003)
- [5] Vetulani, J.: Drug Addiction Part III. Pharmacotherapy of Addiction, *Pol. J. Pharmacol.* 53, 415 – 434 (2001)
- [6] Nestler, E. J.: From neurobiology to treatment: progress against addiction, *Nat. Neurosci.* 5, 1076 – 1079 (2002)
- [7] Cone, E. J. and Preston, K. L.: Toxicologic Aspects of Heroin Substitution Treatment, *Ther. Drug Monit.* 24, 193 – 198 (2002)
- [8] Herranz, R.: Cholecystokinin Antagonists: Pharmacological and Therapeutic Potential, *Med. Res. Rev.* 23, 559 – 605 (2003)
- [9] de Tullio, P., Delarge, J. and Pirotte, B.: Therapeutic and chemical developments of cholecystokinin receptor ligands, *Exp. Opin. Invest. Drugs* 9, 129 – 146 (2000)
- [10] Kirkham, T. C.: Endogenous cannabinoids: a new target in the treatment of obesity, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284, 343 – 344 (2003)

- [11] Fernandez, J. R. and Allison, D. B.: Rimonabant Sanofi-Synthelabo, Curr. Opin. Invest. Drugs 5, 430 – 435 (2004)
- [12] Mahmoudian, M., Jalilpour, H. and Salehian, P.: Toxicity of Peganum harmala: Review and a Case Report, Iran. J. Pharm. Ther. 11, 1 – 4 (2002)
- [13] El-Bahri, L. and Chemli, R.: Peganum harmala L., a poisonous plant of North Africa, Vet. Hum. Toxicol. 33, 276 – 277 (1991)
- [14] Kamel, S., Ibrahim, L., Afifi, A. and Hamza, S.: Major alkaloidal constituents of the Egyptian plant Peganum harmala, Vet. Sciences 7, 71 – 86 (1970)
- [15] Al-Sharma, A., Drake, D. and Flynn, L.: Antimicrobial agents from higher plants. Antimicrobial agents from Peganum harmala seeds, J. Nat. Prod. 44, 745 – 747 (1981)
- [16] Aqeel, A., Khursheed, A. and Sabiha, S.: Study of the in vitro antimicrobial activity of harmin, harmaline and their derivatives, J. Ethnopharmacol. 35, 289 – 294 (1992)
- [17] Lamchouri, F., Settaf, A., Cherrah, Y., Zemzami, M., Lyoussi, B., Zaid, A., Atif, N. and Hassar, M.: Antitumour principles from Peganum harmala seeds, Therapie 54, 753 – 758 (1999)
- [18] Wang, X. and Xie, H.: Antineoplastic alkaloids from Peganum harmala, Drug Future 24, 1333 – 1337 (1999)
- [19] Mothes, K., Schütte, H. R. and Luckner, M.: Biochemistry of Alkaloids, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin, 328 – 329 (1985)
- [20] Hesse, M.: Alkaloide – Fluch oder Segen der Natur?, Verlag Helvetica Chimica Acta Zürich, 59 – 60 (2000)

- [21] Amla, V., Bano, G., Johri, R., Zutshi, U. and Atal, C.: Pharmacokinetics of vasicine in healthy Indian volunteers, *Acta Pharmacol. Sin.* 8, 190 – 192 (1987)
- [22] Sharma, S. C., Siddiqi, M. A., Zutshi, U. and Atal, C. K.: The in-vivo metabolism of vasicine – a potent uterotonic, *Indian Drugs* 8, 431 – 434 (1983)
- [23] Pahwa, G. S., Zutshi, U. and Atal, C. K.: Chronic Toxicity Studies with Vasicine in Rats and Monkeys, *Indian J. Exp. Biol.* 25, 467–470 (1987)
- [24] Tulyaganov, N., Sadritdinov, F. and Suleimanova, G. A.: Pharmacological Characteristics of Desoxypeganine hydrochloride, *Farm. i Toksikol.* 49, 37 – 40 (1986)
- [25] Krieglstein, J.: Pharmakologische und therapeutische Wirksamkeit der Antidementiva, *Pharm. Unserer Zeit* 4, 362 – 368 (2002)
- [26] Mutschler, E.: Arzneimittelwirkungen, 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 297 – 309 (2001)
- [27] Berg, J. M., Tymoczko, J. L. and Stryer, L.: Biochemie, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Berlin, 377 – 389 (2003)
- [28] Kalgutkar, A., Dalvie, D., Castagnoli, N. and Taylor, T.: Interactions of Nitrogen-Containing Xenobiotics with Monoamine Oxidase (MAO) Isozymes A and B: SAR Studies on MAO Substrates and Inhibitors, *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1139 – 1162 (2001)
- [29] Balciuniene, J. and Jazin, E.: Human monoamine oxidase: from genetic variation to complex human phenotypes, *Gene Funct. Dis.* 1, 26 – 37 (2001)
- [30] Livingston, M. and Livingston, H.: Monoamine oxidase inhibitors: An update on drug interactions, *Drug Safety* 14, 219 – 227 (1996)

- [31] Davidson, J.: Pharmacotherapy of social anxiety disorder, *J. Clin. Psychiatry* 59, 47 – 53 (1998)
- [32] Stern, G.: Neuroprotection by selegiline and other MAO inhibitors, *J. Neural Trans. Suppl.* 52, 99 – 107 (1998)
- [33] Thomas, T.: Monoamine oxidase-B inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging* 21, 343 – 348 (2000)
- [34] Bourin, M., Ripoll, N. and Dailly, E.: Nicotinic receptors and Alzheimer's disease, *Curr. Med. Res. Opin.* 19, 169 – 177 (2003)
- [35] Czech, C., Tremp, G. and Pradier, L.: Presenilins and Alzheimer's Disease, *Prog. Neurobiol.* 60, 363 – 384 (2000)
- [36] De Felice, F. and Ferreira, S.: β -Amyloid Production, Aggregation and Clearance as Targets for Therapy in Alzheimer's Disease, *Cell. Mol. Neurobiol.* 22, 545 – 563 (2002)
- [37] Masters, C., Simms, G., Weinman, N., Multhaup, G., McDonald, B. and Beyreuther, K.: Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4245 – 4529 (1985)
- [38] Selkoe, D.: Amyloid β -Protein and the Genetics of Alzheimer's Disease, *J. Biol. Chem.* 271, 18295 – 18298 (1996)
- [39] Lambert, M., Barlow, A., Chromy, B., Edwards, C. and Freed, R.: Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6448 – 6453 (1998)

- [40] Dineley, K., Westerman, M., Bui, D., Bell, K., Ashe, K. and Sweatt, J.: Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanism related to Alzheimer's disease, *J. Neurosci.* 21, 4125 – 4133 (2001)
- [41] Gotti, C., Fornasari, D. and Clementi, F.: Human neuronal nicotinic receptors, *Prog. Neurobiol.* 53, 199 – 237 (1997)
- [42] Pettenati, C., Annicchiario, R. and Caltagirone, C.: Clinical pharmacology of anti-Alzheimer drugs, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 17, 659 – 672 (2003)
- [43] Giacobini, E.: Cholinesterases: New Roles in Brain Function and in Alzheimer's Disease, *Neurochem. Res.* 28, 515 – 522 (2003)
- [44] Loetscher, H., Niederhauser, O., Kemp, J. and Gill, R.: Is caspase-3 inhibition a valid therapeutic strategy in cerebral ischemia, *Drug Discov. Today* 6, 671 – 680 (2001)
- [45] Bergmann, E. und Horch, K.: Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes – Kosten alkoholassoziierter Krankheiten, Robert-Koch-Institut, Berlin (2003)
- [46] Burger, M. und Mensink, G.: Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes – Bundes-Gesundheitssurvey: Alkohol, Robert-Koch-Institut, Berlin (2003)
- [47] Hurt, R.: Pharmacotherapy for Alcoholic Smokers, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 26, 1939 – 1941 (2002)
- [48] Balfour, D., Wright, A., Benwell, M. and Birrell, C.: The putative role of extra-synaptic mesolimbic dopamine in the neurobiology of nicotine dependence, *Behav. Brain Res.* 113, 73 – 83 (2000)

- [49] Balfour, D.: The Neurobiology of Tobacco Dependence: a commentary, *Respiration* 69, 7 – 11 (2002)
- [50] Di Chiara, G. and Imperato, A.: Drugs abuse by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rabbits, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5274 – 5278 (1988)
- [51] Benwell, M., Balfour, D. and Anderson, J.: Smoking associated changes in the serotonergic systems of discrete regions of human brain, *Psychopharmacology* 102, 68 – 72 (1990)
- [52] Jensen, M., Sørensen, T., Anderson, A., Thorsen, T., Tolstrup, J., Godtfredsen, N. and Grønbaek, M.: A prospective study of the association between smoking and later alcohol drinking in the general population, *Addiction* 98, 355 – 363 (2003)
- [53] Narahashi, T., Söderpalm, B., Ericson, M., Olausson, P., Engel, J., Zhang, X. and Nordberg, A.: Mechanism of Alcohol-Nicotine Interactions: Alcoholics Versus Smokers, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 25, 152 – 156 (2001)
- [54] Wonnacott, S.: Presynaptic nicotinic Ach receptors, *Trends Neurosci.* 20, 92 – 98 (1997)
- [55] Aistrup, G., Marszalec, W. and Narahashi, T.: Ethanol modulation of nicotinic acetylcholine receptor currents in cultured cortical neurons, *Mol. Pharmacol.* 55, 39 – 49 (1999)
- [56] Leonard, S.: Consequences of Low Levels of Nicotinic Acetylcholine Receptors in Schizophrenia for Drug Development, *Drug Dev. Res.* 60, 127 – 136 (2003)
- [57] George, T. and Krystal J.: Comorbidity of psychiatric and substance abuse disorders, *Curr. Opin. Psych.* 13, 327 – 331 (2000)

- [58] Leonard, S. and Bertrand, D.: Neuronal nicotinic receptors: from structure to function, *Nic. Tob. Res.* 3, 203 – 223 (2001)
- [59] de Leon, J., Dadvand, M., Canuso, C., White, A., Stanilla, J. and Simpson, G. M.: Schizophrenia and smoking: an epidemiological survey in a state hospital, *Am. J. Psychiatry* 152, 453 – 455 (1995)
- [60] Pereira, E., Hilmas, C., Santos, M., Alkondon, M. and Maelicke, A.: Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors, *J. Neurobiol.* 53, 479 – 500 (2002)
- [61] Allen, T. and Mc Evoy, J.: Galantamine for treatment-resistant schizophrenia, *Am. J. Psychiatry* 159, 1244 – 1245 (2002)
- [62] Rosse, R. and Deutsch, S.: Adjuvant galantamine administration improves negative symptoms in a patient with treatment-refractory schizophrenia, *Clin. Neuropharm.* 25, 272 – 275 (2002)
- [63] Liljegren, D. R.: Biosynthesis of Quinazoline alkaloids of *Peganum harmala*, *Phytochemistry* 10, 2661 – 2669 (1971)
- [64] Argade, N. P. and Balasubramanian, V.: Ring Closure Reactions of suitably ortho-substituted Maleanilic Acids: an Avenue for Heterocycles, *Heterocycles* 53, 475 – 488 (1999)
- [65] Mhaske, S. and Argade, N. P.: Concise and Efficient Synthesis of Bioactive Natural Products Pegamine, Deoxyvasicinone, and (-)-Vasicinone, *J. Org. Chem.* 66, 9038 – 9040 (2001)
- [66] Späth, E. and Platzer, N.: Über Derivate des Peganins und ihre Ring-Homologen, *Chem. Ber.* 68, 2221 – 2226 (1935)

- [67] Shakhidayatov, Kh., Irisbaev, A. and Kadyrov, Ch.: Synthesis of deoxypeganine and its derivatives, *Khim. Prir. Soedin.* 5, 681 – 682 (1974)
- [68] Sargazakov, K. D., Aripov, Kh. N., Molchanov, L. V. and Plugar, V. N.: Synthesis of deoxypeganine hydrochloride, *Khim. Prir. Soedin.* 4, 506 – 507 (1990)
- [69] Shakhidayatov, Kh. M., Irisbaev, A., Yun, L. M., Oripov, E. and Kadyrov, Ch. Sh.: Quinazolines VI. Reaction of anthranilic acid and its derivatives with lactams, *Khim. Getero. Soedin.* 11, 1564 – 1569 (1976)
- [70] ICH Topic Q 3 C Impurities: Residual Solvents, Step 4, Consensus guideline, 17 July 1997, Note for Guidance on Impurities: Residual Solvents (CPMP/ICH/283/95), The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA)
- [71] Chatterjee, A. and Ganguly, M.: Self-Condensation of Anthranilic Acid, *J. Org. Chem.* 33, 3358 (1968)
- [72] Staschewski, D.: Der Mechanismus der Clemmensen-Reduktion, *Angew. Chem.* 71, 726 – 736 (1959)
- [73] Yamamura, S. and Nishiyama, S.: Reduction of C=X to CH₂ by Dissolving Metals and Related Methods, *Comprehensive Organic Synthesis*, B. N. Trost and I. Fleming Eds., Vol. 8, Pergamon Press, 307 – 325 (1991)
- [74] Burdon, J. and Price, R. C.: The Mechanism of the Clemmensen Reduction: the Substrates, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 12, 893 – 894 (1986)
- [75] Di Vona, M. L. and Rosnati, V.: Zinc-Promoted Reactions. 1. Mechanism of the Clemmensen Reaction. Reduction of Benzophenone in Glacial Acetic Acid, *J. Org. Chem.* 56, 4269 – 4273 (1991)

- [76] Horner, L. and Schmitt, E.: Mechanismus und Grenzen der Clemmensen-Reduktion des Acetophenons und verwandter Verbindungen, *Liebigs Ann. Chem.*, 1617 – 1633 (1978)
- [77] Morris, R. C., Hanford, W. E. and Adams, R.: Structure of Vasicine III. Position of the Hydroxyl Group, *J. Am. Chem. Soc.* 57, 951 – 954 (1935)
- [78] Tashkhodzhaev, B., Turgunov, K. K. and Kristallovich, E. L.: IR Spectra and Crystal Structure of Hydrochlorides and Complex Salts of 2,3-Polymethylene-3,4-dihydroquinazolines and -4-quinazolones, *Chem. Nat. Comp.* 35, 328 – 331 (1999)
- [79] Tashkhodzhaev, B., Molchanov, L. V., Turgunov, K. K., Makhmudov, M. K. and Aripov, Kh. N.: Crystal and molecular structure of deoxypeganine hydrochloride dihydrate, *Khim. Prir. Soedin.* 3, 421 – 425 (1995)
- [80] Sharma, S. D., Gupta, V. K., Goswami, K. N. and Padmanabhan, V. M.: Crystal structure of deoxyvasicine zinc complex, *Cryst. Res. Technol.* 28, 1115 – 1121 (1993)
- [81] Sargazakov, K. D., Molchanov, L. V. and Tashkhodzhaev, B.: Deoxypeganine chelates, *Khim. Prir. Soedin.* 6, 862 – 864 (1991)
- [82] Kristallovich, E. L., Abdullaev, N. D., Dyakonov, A. L., Molchanov, L. V. and Telezhenetskaya, M. V.: IR spectroscopy of 2,3-Polymethylene-3,4-dihydroquinazolines and their complexes, *Chem. Nat. Comp.* 33, 667 – 669 (1998)
- [83] Hoffman, J. W. and Lauder, I.: Basic Zinc Chlorides, *Aust. J. Chem.* 21, 1439 – 1443 (1968)

- [84] Manske, R. H. F. and Holmes, H. L.: The Alkaloids. Chemistry and Physiology, Volume III, Academic Press Inc., Publishers New York, 102 – 111 (1953)
- [85] Strähle, J. und Schweda, E.: Jander Blasius, Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie, 14. Auflage, S. Hirzel Verlag Stuttgart, 305 – 306 (1995)
- [86] Kirakosyan, A. K. and Eliseev, A. A.: Basic Zinc sulfates, Zhur. Neorg. Khim. 8, 119 – 129 (1963)
- [87] Escobar, M. E., Garcia Martinez, O., Ramirez Garcia, A. and Guerrero Laverat, A.: Hydroxy salts XVI. Bivalent heavy metal hydroxychlorosulfates I. Copper, zinc and cadmium, Ann. Quimica 70, 681 – 687 (1974)
- [88] Bickel, M. H.: The Pharmacology and Biochemistry of N-Oxides, Pharmacol. Rev. 21, 325 – 355 (1969)
- [89] Hucker, H. B.: Intermediates in Drug Metabolism Reactions, Drug Metab. Rev. 2, 33 – 56 (1973)
- [90] Tulyaganov, T. S.: Alkaloids of Nitraria komarovii XIV. Deoxypeganine-N-oxide, Khim. Prir. Soedin. 1, 87 – 88 (1993)
- [91] Tulyaganov, T. S., Kristallovich, E. L. and Abdullaev, N. D.: Alkaloids of Nitraria komarovii XV. Vasicinone and Deoxyvasicinone N-oxides, Khim. Prir. Soedin. 4, 580 – 583 (1993)
- [92] Adam, W., Bialas, J. and Hadjirapoglou, L.: A Convenient Preparation of Acetone Solutions of Dimethyloxirane, Chem. Ber. 124, 2377 (1991)
- [93] Ferrer, M., Sanchez-Baeza, F. and Messeguer, A.: On the Preparation of Amine N-Oxides by using Dioxiranes, Tetrahedron 53, 15877 – 15888 (1997)

- [94] Murray, R. W. and Jeyaraman, R.: Dioxiranes: Synthesis and Reactions of Methyl dioxiranes, *J. Org. Chem.* 50, 2847 – 2853 (1985)
- [95] Coperet, C., Adolfsson, H., Chiang, J. P., Yudin, A. K. and Sharpless, K. B.: A Simple and Efficient Method for the Preparation of Pyridine-N-oxides II., *Tetrahedron Lett.* 39, 761 – 764 (1998)
- [96] Taddei, M. and Ricci, A.: Electrophilic Hydroxylation with Bis(trimethylsilyl) peroxide. A Synthon for the Hydroxyl Cation, *Synthesis* 36, 633 (1986)
- [97] Murray, R. W. and Iyanar, K.: Synthesis of Nitrones using the Methyltrioxorhenium/Hydrogen Peroxide System, *J. Org. Chem.* 61, 8099 – 8102 (1996)
- [98] Schwartz, N. N. and Blumbergs, J. H.: Epoxidations with m-Chloroperbenzoic Acid, *J. Org. Chem.* 29, 1976 – 1979 (1964)
- [99] Craig, J. C. and Purushothaman, K. K.: An improved Preparation of Tertiary Amine N-Oxides, *J. Org. Chem.* 35, 1721 – 1723 (1970)
- [100] Khutier, A. H., Al-Mallah, K. Y., Hanna, S. Y. and Abdulla, N. A.: Studies of Tertiary Amine Oxides 9. Thermal Rearrangement of 1-(4-Substituted-phenyl)piperidine N-Oxides to the Corresponding N-Hydroxylamines, *J. Org. Chem.* 52, 1710 – 1713 (1987)
- [101] Theil, F. P., Pöhlmann, H., Pfeifer, S. and Franke, P.: Fotochemische Reaktivität von Methaqualon-1-oxid, *Pharmazie* 40, 328 – 331 (1985)
- [102] Rücker, G., Neugebauer, M. and Willems, G. G.: Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 109 – 136 (1992)

- [103] Nakanishi, K.: Infrared Absorption Spectroscopy, Holden-Day, Inc., San Francisco and Nankodo Company Limited Tokyo, 50 – 53 (1962)
- [104] Kobayashi, S., Satoh, S., Numata, A., Shingu, T. and Kihara, M.: Alkaloid N-oxides from *Lycoris sanguinea*, *Phytochemistry* 30, 675 – 677 (1991)
- [105] Katagi, M., Tatsuno, M., Miki, A., Nishikawa, M., Nakajima, K. and Tsuchihashi, H.: Simultaneous determination of selegiline-N-oxide, a new indicator for selegiline administration, and other metabolites in urine by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 759, 125 – 133 (2001)
- [106] Clement, E. M. and Franklin, M.: Simultaneous measurement of zolmitriptan and its major metabolites N-desmethylozmilriptan and zolmitriptan N-oxide in human plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection, *J. Chromatogr. B* 766, 339 – 343 (2002)
- [107] Markowitz, J. S. and Patrick, K. S.: Thermal degradation of clozapine-N-oxide to clozapine during gas chromatographic analysis, *J. Chromatogr. B* 668, 171 – 174 (1995)
- [108] Mosier, K. E., Song, J., McKay, G., Hubbard, J. W. and Fang, J.: Determination of clozapine and its metabolites, N-desmethylozapine and clozapine N-oxide in dog plasma using high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 783, 377 – 382 (2003)
- [109] Laihia, K., Kolehmainen, E., Kauppinen, R., Lorenc, J. and Puszek, A.: Multinuclear ^1H , ^{13}C and ^{15}N NMR study of some substituted 2-amino-4-nitropyridines and their N-oxides, *Spectrochim. Acta* 58, 1425 – 1435 (2002)

- [110] Khutier, A. H., Al-Rawi, J. M. A. and Hanna, S. Y.: Studies of Tertiary Amine Oxides Part 15, *Spectrosc. Lett.* 22, 549 – 560 (1989)
- [111] Alcazar, J., de la Hoz, A. and Begtrup, M.: Carbon-13 NMR Spectra of Imidazole 1-Oxides. Comparison with the Parent Imidazoles, *Magn. Reson. Chem.* 36, 296 – 299 (1998)
- [112] Provera, S., Marchioro, C., Davailli, S. and Case, N.: ^1H and ^{13}C NMR Spectra of Pyrido[2,3-b]pyrazines and Pyrido[2,3-b]pyrazine-N-oxides, *Magn. Reson. Chem.* 35, 342 – 347 (1997)
- [113] Kuhnert, N.: Microwave-Assisted Reactions in Organic Synthesis – Are There Any Nonthermal Microwave Effects?, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 1863 – 1866 (2002)
- [114] Nuechter, M., Ondruschka, B., Bonrath, W. and Gum, A.: Microwave assisted synthesis – a critical technology overview, *Green Chem.* 6, 128 – 141 (2004)
- [115] Sridar, V.: Microwave radiation as a catalyst for chemical reaction, *Curr. Sci.* 74, 446 – 450 (1998)
- [116] Brandon, E. F. A., Raap, C. D., Meijerman, I., Neijnen, J. H. and Schellens, J. H.: An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189, 233 – 246 (2003)
- [117] Langer, A.: Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Untersuchung der Biotransformation von Arzneistoffen, *Pharm. Unserer Zeit* 4, 207 – 218 (1995)
- [118] Gillette, J. R., Lau, S. S. and Monks, T. J.: Intra- and extra-cellular formation of metabolites from chemically reactive species, *Biochem. Soc. Trans.* 12, 4 – 7 (1984)

- [119] Guengerich, F. P.: Common and uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity, *Chem. Res. Toxicol.* 14, 611 – 650 (2001)
- [120] Anzenbacher, P. and Anzenbacherova, E.: Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics, *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 737 – 747 (2001)
- [121] Cytochrom P450 Datenbank: <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>
- [122] Guengerich, F. P.: Cytochrome P-450 3A4: Regulation and Role in Drug Metabolism, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 1 – 17 (1999)
- [123] Zanger, U. M., Raimundo, S. and Eichelbaum, M.: Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 369, 23 – 37 (2004)
- [124] Yan, Z. and Caldwell, G. W.: Metabolism Profiling, and Cytochrome P450 Inhibition & Induction in Drug Discovery, *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 403 – 425 (2001)
- [125] Sachse, C., Brockmoller, J., Bauer, S. and Roots, I.: Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences, *Am. J. Hum. Genet.* 60, 284 – 295 (1997)
- [126] Daly, A. K.: Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 17, 27 – 41 (2003)
- [127] Shin, J. G., Soukhouva, N. and Flockhart, D. A.: Effect of antipsychotic drugs on human liver cytochrome P-450 (CYP) isoforms in vitro: preferential inhibition of CYP 2D6, *Drug Metab. Dispos.* 27, 1078 – 1084 (1999)
- [128] Clement, B.: The N-Oxidation of benzamidines in vitro, *Xenobiotica* 13, 467 – 473 (1983)

- [129] Clement, B.: Biotransformation stark funktioneller Gruppen durch Stickstoffoxidation, HochschulSammlung Naturwissenschaft Chemie und Pharmazie Band 3 (1986)
- [130] Plugar, V. N., Rashkes, Y. V. and Tulyaganov, N.: Quantitative analysis of the components of deoxypeganine and deoxyvasicinone metabolites, Khim. Prir. Soedin. 2, 201 – 206 (1981)
- [131] Plugar, V. N., Abdullaev, N. D., Rashkes, Y. V., Yagudaev, M. R. and Tulyaganov, N.: Structure of deoxypeganine and deoxyvasicinone metabolites, Khim. Prir. Soedin. 6, 758 – 766 (1983)
- [132] Pindur, G. and Pindur, U.: Klinische Chemie und serologische Laboratoriumsdiagnostik für Pharmazeuten und Mediziner, 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 244 – 255 (1991)
- [133] Gornall, A. G., Bardawill, C. J. and David, M. M.: Determination of Serum Proteins by means of the Biuret Reaction, J. Biol. Chem. 177, 751 – 766 (1948)
- [134] Klingenberg, M.: Pigments of rat liver microsomes, Arch. Biochem. Biophys. 75, 376 – 386 (1958)
- [135] Garfinkel, D.: Studies on pig liver microsomes I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions, Arch. Biochem. Biophys. 77, 493 – 509 (1958)
- [136] Omura, T. and Sato, R.: The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes I. Evidence for its Hemoprotein Nature, J. Biol. Chem. 239, 2370 – 2378 (1964)

- [137] Omura, T. and Sato, R.: The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes II. Solubilization, Purification and Properties, *J. Biol. Chem.* 239, 2379 – 2385 (1964)
- [138] Sams, C., Loizou, G. D., Cocker, J. and Lennard, M.: Metabolism of ethylbenzene by human liver microsomes and recombinant human cytochrome P450's, *Toxicol. Lett.* 147, 253 – 260 (2004)
- [139] Lin, Y., Lu, P., Tang, C., Mei, Q., Sandig, G., Rodrigues, A. D., Rushmore, T. H. and Shou, M.: Substrate inhibition kinetics for cytochrome P450-catalyzed reactions, *Drug Metab. Dispos.* 29, 368 – 374 (2001)
- [140] Stahl, P. H. and Wermuth, C. G.: Handbook of Pharmaceutical Salts, Verlag Helvetica Chimica Acta Zürich, 1 – 8 (2002)
- [141] Bastin, R. J., Bowker, M. J. and Slater, B. J.: Salt Selection and Optimisation Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities, *Org. Proc. Res. Dev.* 4, 427 – 435 (2000)
- [142] Giron, D.: Characterisation of Salts of Drug Substances, *J. Therm. Anal. Cal.* 73, 441 – 457 (2003)
- [143] Stahl, P. H. and Wermuth, C. G.: Handbook of Pharmaceutical Salts, Verlag Helvetica Chimica Acta Zürich, 191 – 220 (2002)
- [144] Knoch, A. and Merkle, H. P.: Theorie und Praxis transdermaler Freigabesysteme, *Acta Pharm. Technol.* 31, 197 – 209 (1985)
- [145] Asmussen, B.: Transdermal Therapeutic Systems – Actual State and Future Developments, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 13, 343 – 351 (1991)
- [146] Berner, B. and John, V. A.: Pharmacokinetic Characterisation of Transdermal Delivery Systems, *Clin. Pharmacokinet.* 26, 121 – 134 (1994)

- [147] Übersicht von der FDA über zugelassene Transdermale Therapeutische Systeme:
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/>
- [148] Schiller, M. and Schmidt, P. C.: Transdermale Therapeutische Systeme – Arzneistoffe zum Aufkleben, *Pharm. Ztg.* 22, 18 – 26 (2002)
- [149] Prausnitz, M. R., Mitragotri, S. and Langer, R.: Current Status and Future Potential of Transdermal Drug Delivery, *Nat. Rev. Drug Discovery* 3, 115 – 124 (2004)
- [150] Plewig, G., Jansen, T. and Schürer, N. Y.: Das Stratum corneum, *Hautarzt* 48, 510 – 521 (1997)
- [151] Melnik, B. C.: Biochemie und Pathobiochemie des epidermalen Lipidstoffwechsels, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1 – 298 (1990)
- [152] Landmann, L.: The epidermal permeability barrier, *Anat. Embryol.* 178, 1 – 13 (1988)
- [153] Karande, P., Jain, A. and Mitragotri, S.: Discovery of transdermal penetration enhancers by high-throughput screening, *Nat. Biotechnol.* 22, 192 – 197 (2004)
- [154] Barry, B. W.: Breaching the skin's barrier to drugs, *Nat. Biotechnol.* 22, 165 – 167 (2004)
- [155] Mitragotri, S.: Effect of Bilayer Disruption on Transdermal Transport of Low-Molecular Weight Hydrophobic Solutes, *Pharm. Res.* 18, 1018 – 1023 (2001)
- [156] Suhonen, T. M., Bouwstra, J. A. and Urtti, A.: Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations, *J. Control. Rel.* 59, 149 – 161 (1999)
- [157] Finnin, B. C. and Morgan, T. M.: Transdermal Penetration Enhancers: Applications, Limitations and Potential, *J. Pharm. Sci.* 88, 955 – 958 (1999)

- [158] Franz, T. J.: Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data, J. Invest. Dermatol. 64, 190 – 195 (1975)
- [159] Slivka, S. R., Landeen, L. K., Zeigler, F. and Zimmer, M. P.: Characterization, barrier function and drug metabolism of an in vitro skin model, J. Invest. Dermatol. 160, 40 – 46 (1993)
- [160] Ponc, M., Boelsma, E., Gibbs, S. and Mommaas, M.: Characterization of Reconstructed Skin Models, Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. 15, 1 – 17 (2002)
- [161] Lotte, C., Patouillet, C., Zanini, M., Messenger, A. and Roguet, R.: Permeation and Skin Absorption: Reproducibility Human Skin Models, Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. 15, 18 – 30 (2002)
- [162] Regnier, M., Caron, U., Reichert, U. and Schaefer, H.: Barrier function of human skin and human reconstructed epidermis, J. Pharm. Sci. 82, 404 – 407 (1993)
- [163] Schmook, F. P., Meingassner, J. G. and Billich, A.: Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption, Int. J. Pharm. 215, 51 – 56 (2001)
- [164] Koch, A.: Entwicklung eines Transdermalen Therapeutischen Systems mit Morphin für die Schmerztherapie, Dissertation, Marburg (2000)
- [165] Adam, B.: Untersuchungen zur Hautpermeation von Opiatsalzen organischer Säuren, Dissertation, Marburg (1999)
- [166] DAB 9 Kommentar, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Govi-Verlag GmbH Frankfurt, Monographie Methaqualon (1998)
- [167] van Zyl, E. F.: A survey of reported synthesis of methaqualone and some positional and structural isomers, Forensic Sci. Int. 122, 142 – 149 (2002)

- [168] Wolfe, J. F., Rathman, T. L., Sleevi, M. C., Campbell, J. A. and Greenwood, T. D.: Synthesis and Anticonvulsant Activity of Some New 2-Substituted 3-Aryl-4(3H)-quinazolinones, *J. Med. Chem.* 33, 161 – 166 (1990)
- [169] Soliman, R. and Soliman, F.: A Facile Synthesis of 2,3-Disubstituted 4-Oxo-3,4-dihydroquinazolines, *Synthesis* 10, 803 – 804 (1979)
- [170] Kacker, I. K. and Zaheer, S. H.: Potential Analgesics Part I. Synthesis of substituted 4-Quinazolones, *J. Indian Chem. Soc.* 28, 344 – 346 (1951)
- [171] Singh, S. P., Parmar, S. S., Stenberg, V. I. and Akers, T. K.: Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of Methaqualone, *J. Heterocycl. Chem.* 15, 53 – 56 (1978)

Lebenslauf

11.03.1974	Geboren in Frankfurt am Main
1980-1984	Besuch der Grundschule in Hofheim-Langenhain
1984-1990	Besuch der Weingarten-Gesamtschule, Gymnasialzweig in Kriftel
1990-1993	Besuch des MTS-Gymnasiums in Hofheim
05/1993	Abitur
09/1993-11/1994	Wehrersatzdienst im Bereich der mobilen Altenpflege in Hofheim
04/1995-04/2000	Studium der Pharmazie an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
08/1995	Famulatur in der Stein'schen Apotheke in Hofheim am Taunus
09/1996	Famulatur im Klinikum der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main
04/1998	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
04/2000	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
05/2000-10/2000	Pharmazie-Praktikum bei der Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG in Frankfurt am Main
11/2000-04/2001	Pharmazie-Praktikum in der Struwwelpeter-Apotheke in Frankfurt am Main
05/2001	Approbation als Apotheker
08/2001	Beginn der vorliegenden Dissertation am Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. R. Matusch
08/2001-10/2004	wissenschaftliche Hilfskraft an der Philipps-Universität Marburg, Institut für Pharmazeutische Chemie

